

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1968 - N° 36

PREMIERE THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES METABOLITES A FONCTION N-OXYDE

Travail expérimental sur la Nicotinamide, la Coramine et la Pyribenzamine.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté : REVUE SUR LES AMINOXYDES TENSIO - ACTIFS

Synthèse, propriétés, utilisations.

THESES

présentées

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

et soutenues publiquement le 13 Décembre 1968

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie d'Etat

par

Madame Renée CHAMBON, née MOUGENOT

NÉE LE 16 JANVIER 1939

A LEVALLOIS-PERRET (92)

Assistante chargée des fonctions de Chef

de

Travaux Pratiques de Toxicologie

Licenciée ès-Sciences

C.E. S. d'Hématologie

C.E.S. d'Immunologie Générale et Appliquée



FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1968 - N° 36

PREMIERE THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES METABOLITES A FONCTION N-OXYDE

Travail expérimental sur la Nicotinamide, la Coramine et la Pyribenzamine.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté : REVUE SUR LES AMINOXYDES TENSIO - ACTIFS

Synthèse, propriétés, utilisations.

THESES

présentées

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

et soutenues publiquement le 13 Décembre 1968

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie d'Etat

par

Madame Renée CHAMBON, née MOUGENOT

NÉE LE 16 JANVIER 1939

A LEVALLOIS-PERRET (92)

Assistante chargée des fonctions de Chef

de

Travaux Pratiques de Toxicologie

Licenciée ès-Sciences

C.E. S. d'Hématologie

C.E.S. d'Immunologie Générale et Appliquée





FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL de la FACULTE

Doyen Honoraire :

M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen :

M. J.F. CIER

Assesseurs :

M.M. LEVRAT - M. J. DORCHE

Conseiller Administratif :

M.H. PRUVOST

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. TRILLAT - GARIN - GATE - SANTY - GUILLEMINET - HERMANN - ROCHET -
POLLOSSON - ENSELME - WERTHEIMER - SARROUY - BANSILLON - DECHAUME -
IACROIX - CHAMBON

PROFESSEURS

MM. J. CIBERT	Clinique urologique
P. PONTIUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
R. FROMENT	Clinique de prophylaxie cardio-vasculaires
P. CROIZAT	Clinique médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale C
L. REVOL	Pharmacie galénique
H. PIGEAUD	Clinique obstétricale
J. BOURRET	Médecine du travail
M. LEVRAT	Clinique médicale A
R. SCHIER	Bactériologie - Virologie - Immunologie
G. METIEN	Botanique et Cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique
P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonologie
L. PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
H. THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie
J. CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
M. DARGENT	Clinique Carcinologique
M. BERGER (1)	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
A. GUICHARD	Anatomie Pathologique

MM. P. GIRARD	Clinique Neuro-Psychiatrique de d'Hygiène mentale
M. GIRARD	Clinique médicale D
M. LATARGET	Anatomie
R. PEYCELON	Clinique chirurgicale B
A. VACHON	Pathologie Médicale
P. GALY	Physio-Pathologie des Voies Respiratoires
J. PAPILLON	Radiologie
M. JEUNE	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du Premier Age
A. GONIN	Thérapeutique
P. MONNET	Clinique Médicale Infantile B
J. CHATONNET	Physiologie B
P. GUINET	Clinique Endocrinologique
H. COLLET (1)	Chimie Générale et Pharmaceutique
A. TRILLAT	Clinique de Chirurgie Orthopédique
Ch. FREIDEL	Clinique Stomatologique
J. MARION	Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie Infantiles
J. DORCHE	Matière Médicale et Législation Pharmaceutique
L. MANSUY	Neurochirurgie
L. REVOL (1)	Hématologie
J. LECUIRE (1)	Neurochirurgie
H. LIARAS (1)	Clinique chirurgicale propédeutique
L. PERROT	Chimie
J.F. CIER	Physiologie A
J. PERRIN	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
P. GOINARD (1)	Clinique Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie-expérimentale
P. MICHAUD	Clinique de Chirurgie cardiaque
M. PONT (1)	Séméiologie Médicale
J. TRAEGER	Clinique de Néphrologie et maladies métaboliques
J. MATHIEU	Clinique Gynécologique
G. FAUCON	Biologie Médicale et Pharmacodynamie
A. BERTOYE	Clinique des maladies infectieuses
G. VIGNON	Hydrologie Thérapeutique, Climatologie et Ecologie Sociale
D. VINCENT	Biocimie appliquée
A. CIER	Pharmacodynamie
L. COLOBERT	Chimie biologique et médicale
P. MAGNIN	Physiologie et Pathologie obstétricale
J. THIVOLET	Hygiène et Action Sanitaire et Sociale
M. PLAUCHU (1)	Séméiologie et Médecine Générale
J. FRANCILLON	Séméiologie Chirurgicale
C. GIROD	Histologie et Embryologie
R. MALLEIN (1)	Chimie analytique
C. DESPIERRES (1)	Médecine Générale
M. JOUVET	Pathologie générale et expérimentale
X	Pathologie chirurgicale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. E. ROMAN	Parasitologie
J. FEROLDI	Anatomie pathologique
R. MORET	Physique biologique
L. ODDOUX	Botanique et Cryptogamie
J.P. GARIN	Parasitologie
F. TOLOT	Médecine du travail
D. COLOMB	Dermatologie
R. FRANCOIS	Pédiatrie
M. COLIN	Médecine Légale
F. LARBRE	Pédiatrie
J. GRAS	Chimie Biologique
R. MORNEX	Médecine Générale
J.O. PEYRIN	Physique Biologique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. R. CREYSSSEL	Chimie Biologique
J. GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
J. DESCOTES	Chirurgie Générale
M. TOMMASI	Anatomie pathologique
P. BUFFARD	Electro-Radiologie
E. LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
Fr. de MOURGUES	Stomatologie
H. NAUSSAC	Maladies infestieuses
J. REBOUILLAT	Chirurgie Générale
G. ROMAGNY	Pédiatrie
J.P. DELAHAYE	Médecine Générale
R. DELEUZE	Anesthésiologie
A. MICHEL	Anesthésiologie
R. LAMBERT	Médecine Générale
D. FRIES	Médecine Générale
R. GILLY	Pédiatrie
J. ROBERT	Médecine Générale
A. BOUCHET	Anatomie
M. BETHENOD	Pédiatrie
D. GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
J.C. KALB	Pneumo-phtisiologie
J. SOUSTELLE	Chirurgie Générale
J.J. VIALA	Médecine Générale
P. VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
J.A. BERTRAND	Chimie biologique
G. MARET	Chirurgie générale
J. VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
L.C. CHOLLAT	Electro-Radiologie
J. FLEURETTE	Bactériologie
R. FLANDROIS	Physiologie
P. MOREL	Hématologie

MM. H. TERMET	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
A. FREDERICH	Pharmacologie
M. DAUDET	Chirurgie Infantile
J. BRUNE	Médecine Générale et Thérapeutique
R. LOMBARD-PLATET	Chirurgie Générale
M. BOUVIER	Rhumatologie
F. FREYCON	Pédiatrie
C. LAPRAS	Neuro-Chirurgie
M. PELLET	Physiologie
J. DUQUESNEL	Electro-radiologie
H. DEJOUR	Orthopédie et Traumatologie
G. MOULIN	Dermato-Vénérologie
M. PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-phtisiologie
P. PALLIARD	Médecine générale et Thérapeutique
A. MORGON	Oto-rhino-laryngologie
M. PAUPERT-RAVAULT	Ophtalmologie
J. MOTIN	Anesthésiologie
J. PASQUIER	Médecine Générale et Thérapeutique
J.L. VAUZELLE	Anatomie pathologique
J.C. CZYBA	Histologie et Embryologie
M. CABANAC	Physiologie
R. TOURAINE	Pneumo-phtisiologie
A. BEL	Médecine Générale et Thérapeutique
F. CHARVET	Gynécologie - Obstétrique
M. MAYER	Cancérologie
G. BRAILLON	Anatomie et Chirurgie Générale
H. VILLIERS	Chirurgie Générale
P. LOUISOT	Chimie biologique et Chimie des Explorations fonctionnelles
J. COURJON	Neuro-Psychiatrie
J. LAIR	Stomatologie
Mme A. PINET	Electro-Radiologie
B. SCHOTT	Neuro-Psychiatrie
H. DUMONT	Obstétrique
A. NOTTER	Gynécologie Obstétrique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. J. FAVRE-GILLY	Hématologie
G. RIFFAT	Hygiène
M. ROLLET	Pharmacie galénique
C. BIZOLLON	Physique

AGREGES EN EXERCICE

M. DEVIC	Médecine Générale
R. HUGONIER	Ophtalmologie
G. ALLEGRE	Neuro-chirurgie

MM. A. GARDE	Médecine Générale
R. FAYSSÉ	Orthopédie
J. GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
A. PERRIN	Médecine Générale
J. NORMAND	Médecine Générale
A. MOUNIER-KUHN	Chirurgie Générale
J.L. CHASSARD	Electro-radiologie
R. GARNIER	Obstétrique
P. DUMAS	Stomatologie
J. SCHNEPP	Orthopédie
G. NOEL	Médecine Générale

Examineurs de la Thèse :

- Président : M. le Professeur M. CHAMBON
- Assesseurs : MM. L. PERROT
 - A. CIER
 - J. GRAS

A MES PARENTS,

en gage de toute mon affection.

A MES BEAUX-PARENTS,

en affectueux témoignage.

A MON MARI,

qui a su partager le poids de ce travail.

A TOUS LES MIENS.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur M. CHAMBON

Professeur honoraire de Chimie Organique et Toxicologie

Ex-Pharmacien des Hôpitaux

Officier de la Légion d'Honneur

que nous avons toujours beaucoup admiré pour son enseignement, au cours de nos études pharmaceutiques. Il nous a fait l'honneur de nous confier tout d'abord une enrichissante mission d'enseignement, puis un passionnant travail de recherche, au cours duquel il n'a pas cessé de nous encourager, de nous apporter une aide concrète, et de nous prodiguer ses conseils judicieux, doublés de sa bienveillante affection.

Nous lui dédions tout particulièrement ce travail, en gage de notre profonde et affectueuse gratitude.

A NOS JUGES,

Monsieur le Professeur L. PERROT

qui nous dispensa de façon attrayante les premiers rudiments des sciences toxicologiques.

Il a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Qu'il trouve ici l'expression de nos vifs remerciements.

Monsieur le Professeur A. CIER,

à l'occasion d'un intéressant travail bibliographique, dont il nous fournit le sujet, les portes de son laboratoire nous furent largement ouvertes, et n'ont cessé de l'être depuis. Nous le remercions d'avoir bien voulu, une fois de plus, participer au jugement de notre travail.

Monsieur le Professeur J. GRAS,

Nous fûmes parmi ses premiers élèves, qui purent aussitôt apprécier la clarté et la richesse de son enseignement magistral.

Il nous a fait l'honneur d'accepter de figurer parmi nos juges, et nous l'en remercions très sincèrement.

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON.

I N T R O D U C T I O N

En abordant la possibilité d'effectuer un travail personnel dans un domaine où nos études antérieures pharmaceutiques et toxicologiques nous ouvraient de larges perspectives, nous repensâmes à l'impression que nous fit autrefois la connaissance des travaux de POLONOVSKI et NITZBERG sur cette molécule aminoxydée de l'ésérine, qu'ils trouvèrent à côte de l'ésérine elle-même lors de l'extraction des alcaloïdes de la Fève de Calabar, et qu'ils furent amenés, à la suite de considérations biologiques, à dénommer "génésérine". D'une façon générale, on vit par la suite que la plupart des aminoxydes alcaloïdiques présentaient une moindre toxicité que la substance d'origine. De plus ils pouvaient, au cours de leur passage dans l'organisme, subir une réduction avec retour à la substance-mère et à ses propriétés pharmacodynamiques. Cependant, en pratique la toxicologie ignorait ces molécules aminoxydées, qui échappaient aux filets de la classique et si précieuse méthode de STAS OTTO et OGIER. D'autre part certaines molécules, notamment porteuses d'atomes d'azote internucléaires, telles que la spartéine, se révélaient particulièrement sensibles à l'oxydation (Pr. M. CHAMBON 1957), engendrant aisément des aminoxydes, et par là risquaient de conduire encore à des confusions.

Aussi nous parut-il intéressant de nous attacher à la mise en évidence d'éventuels métabolites N-Oxydes pouvant se former au cours de la traversée de l'organisme, par diverses molécules, de préférence médicamenteuses et hétérocycliques. Les nécessités de l'expérimentation animale nous amenèrent à choisir parmi les médicaments de toxicité moyenne, et notre choix

s'arrêta sur les dérivés pyridiniques β -substitués que sont la nicotinamide (Vitamine PP), et son dérivé diéthylié, la nicéthamide (Coramine), analeptique cardio-vasculaire, et sur un dérivé α -substitué, le chlorhydrate de tripélennamine (Pyribenzamine), aux propriétés antihistaminiques, qui nous offrait la gageure d'être une molécule pyridinique porteuse de deux fonctions amine tertiaire.

Cependant, la première phase bibliographique de ce travail nous permit de nous rendre compte du développement très inégal des travaux antérieurs sur ces diverses molécules, mais par contre du très grand nombre de recherches entreprises avec le triméthylaminoxyde.

L'aspect toxicologique, pur ou lié aux considérations pharmacodynamiques, c'est-à-dire rapporté vraisemblablement à des quantités très minimes de substance aminoxyde, nous conduisirent à nous familiariser davantage avec ces molécules, en reprenant l'essentiel des données sur les aminoxydes. Pour cela, nous fûmes amené à reproduire en partie l'expérimentation antérieure concernant notamment le triméthylaminoxyde (TMAO), celui-ci nous servant de référence pour les dérivés N-Oxydes d'amines tertiaires.

Nous nous sommes proposé, pour chacune des molécules étudiées, de procéder d'une part à un exposé des travaux antérieurs correspondants, visant à la fois les caractères physico-chimiques et analytiques, et l'aspect métabolique, et d'autre part de présenter nos travaux personnels, orientés essentiellement sur la recherche de métabolites N-Oxydes qui pourraient s'éliminer dans les urines.

Pour une même molécule, nous envisagerons successivement la synthèse du dérivé N-Oxyde, la définition de sa constitution et ses caractères physico-chimiques, la méthode de révélation chromatographique la plus sensible, et les techniques de dosage. L'étude métabolique comportera, après ingestion par le cobaye, la récolte des urines, et la mise en évidence d'un éventuel métabolite N-Oxyde, suivie de son dosage.

Le plan suivi dans cette thèse est donc le suivant :

- I. Généralités sur les aminoxydes (N-Oxydes)
 - II. Triméthylamine et Triméthylaminoxyde :
 - travaux antérieurs
 - travaux personnels
 - III. Nicotinamide et Nicotinamide N-Oxyde :
 - travaux antérieurs
 - travaux personnels
 - IV. Coramine (nicéthamide) et Coramine N-Oxyde :
 - travaux antérieurs
 - travaux personnels
 - V. Pyribenzamine (chlorhydrate de tripélenamine) et Pyribenzamine N-Oxyde :
 - travaux antérieurs
 - travaux personnels
 - VI. Discussion
 - VII. Conclusions
 - VIII. Bibliographie.
-

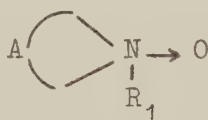
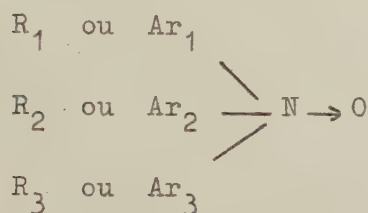
Premier Chapitre

GENERALITES SUR LES AMINOXYDES

(N-OXYDES)

I - INTRODUCTION

Les aminoxydes sont des composés naturels ou synthétiques, caractérisés par la présence d'une liaison de coordinence entre un atome d'azote aminé aliphatique, aromatique ou hétérocyclique, et un atome d'oxygène :



R = radical aliphatique

A = hétérocycle

B = hétérocycle

Ar = radical aromatique

azoté, type

azoté, type

pipéridine

pyridine

C'est pourquoi il serait plus exact de les regrouper sous le vocable plus général de N-Oxydes, que nous adopterons dans le texte.

Le premier composé de ce type fut synthétisé par PINNER (1892) qui réalisa la préparation du N-Oxyde de nicotine. Puis, en 1898, DUNSTAN et GOULDING, synthétisèrent le N-Oxyde de triméthylamine, appelé par eux triméthylaminoxyde ou TMAO. Mais il fallut attendre l'année 1909 pour que SUWA découvre ce dernier composé dans un milieu biologique constitué par du muscle du requin "Acanthias Vulgaris".

Depuis lors, il a été trouvé de nombreux N-Oxydes à l'état naturel dans le règne animal et végétal. Parmi les alcaloïdes connus, citons la "généserine", extraite de la fève de Calabar, et étudiée par POLONOVSKI dès 1917, qui fut le point de départ de très nombreux travaux sur la N-Oxydation naturelle ou synthétique de diverses substances alcaloïdiques.

La iodinine, pigment rouge isolé à partir de "Chromobacter iodinium", par CLEMO (1938, 1950), fut identifiée au di-N-Oxyde de 1-6 phénazine.

L'acide aspergillique, extrait de "Aspergillus Flavus", serait un N-Oxyde d'hydroxydiazine (DUNN 1949).

Dans le règne végétal, chez les séneçons, lupins et héliotropes, ont été trouvés des N-Oxydes pyrrolizidiniques (CULVENOR 1953).

Actuellement, nous devons à la synthèse chimique de nombreux N-Oxydes, qui trouvent leur application dans le domaine thérapeutique - comme nous le verrons par la suite -, ou dans le domaine industriel - comme c'est le cas pour les détergents de la série des N-Oxydes d'amines grasses -.

Enfin il est apparu que, au cours du métabolisme de quelques substances médicamenteuses, on retrouvait des N-Oxydes dans les produits d'élimination. Mais ces métabolites, souvent plus hydrosolubles que la base azotée dont ils dérivent, risquent soit d'échapper totalement à la détection par la classique méthode de STAS, OTTO et OGIER (CHAMBON 1957), soit d'être fort difficiles à séparer si la différence de solubilité est moins accusée. Nous nous sommes trouvé dans ce cas au cours de nos travaux personnels.

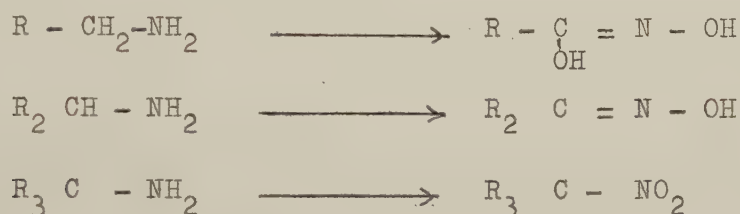
L'intérêt de ces métabolites n'est que partiellement exploité, mais il semble qu'ils puissent jouer un rôle dans la détoxication des produits azotés dans l'organisme, soit en intervenant dans les mécanismes de désalcoylation oxydative, soit comme forme d'élimination plus soluble et moins toxique.

Nous envisagerons successivement la synthèse, les propriétés physico-chimiques, et enfin les propriétés physiologiques des N-Oxydes, sans toucher toutefois au domaine de la nicotinamide, ou de la triméthylamine, qui font l'objet de chapitres particuliers.

II - SYNTHESE

a) Conditions générales d'obtention d'un N-Oxyde : La formation des N-Oxydes ne s'observe que par oxydation des amines aromatiques ou aliphatiques trisubstituées, ou encore dans le cas des composés azotés hétérocycliques, sinon l'on obtient des composés tout à fait différents (GRIGNARD 1941).

Ainsi dans le cas de l'oxydation au niveau d'un atome d'azote primaire, le produit de réaction variera suivant que l'atome d'azote sera rattaché à un atome de carbone primaire, secondaire ou tertiaire : il se formera un acide hydroxamique, une oxime ou un composé nitré :



Dans le cas d'un azote secondaire, on obtient une hydroxylamine, puis un dérivé nitré ou nitrosé.

Seul l'atome d'azote tertiaire convient donc pour la formation d'un dérivé N-Oxyde.

Cependant la N-Oxydation n'est pas toujours réalisable. C'est ainsi que les groupements carboxyliques en position β , empêchent la formation des N-Oxydes, dans le cas de l'ecgonine et de l'arécaïdine (TAGHAVI 1938). Même dans le cas d'un composé azoté tertiaire, certains substituants stériquement trop volumineux, peuvent jouer un rôle défavorable : c'est ce que l'on constate dans le cas des di-alcoyl-naphtylamines (TAGHAVI 1939) ou de la triphénylamine (BURCKARD 1963).

Dans le cas des amines aromatiques, certaines positions des substituants interviennent : ainsi un groupement alcoxy en para, sera sans effet; par contre un groupement carbonyle en alpha, supprime toute possibilité d'oxydation sur l'azote, comme on le constate dans le cas des amides et uréides substituées (LEBEDEV 1960). Il en est de même pour les groupements hydroxy- ou chloro-, en alpha (CULVENOR 1953).

En effet l'oxydabilité est directement liée à la basicité du composé étudié : plus le composé est basique, plus le doublet libre sur l'azote est repoussé et tend à se lier à l'oxygène pour compléter son octet. Or la basicité augmente avec le nombre de substituants nucléophiles, donneurs d'électrons.

Il faut également penser aux réactions secondaires : en effet l'oxydation n'a pas toujours lieu sélectivement sur l'atome d'azote tertiaire, et d'autres transformations éventuelles sont à envisager. C'est le cas des composés possédant une double liaison, susceptible de s'époxyder; c'est le cas aussi pour les esters, qui seront hydrolysés, ainsi qu'on a pu l'observer pour l'aconitine ou la pilocarpine, ainsi que l'atropine, l'hyosciamine, et la scopolamine (TAGHAVI 1938).

Parmi les composés hétérocycliques relativement faciles à N-oxyder, citons la pyridine, la quinoléine, la pyrrolidine, et la pipéridine (TAGHAVI 1938). D'une façon générale, ces composés sont moins oxydables que les aliphatiques, mais beaucoup plus que les aromatiques.

Par ailleurs, le rôle du solvant sur la basicité du composé, et par là même sur son oxydabilité, n'est pas à négliger : on constate ainsi que les solvants à constante diélectrique élevée (tels que l'eau, le méthanol ou l'éthanol), qui exaltent la basicité du composé, font également croître la vitesse d'oxydation (ACHER 1964).

b) Cinétique de la réaction d'oxydation : Il est intéressant maintenant d'étudier la réaction de N-oxydation, du point de vue cinétique. Pour cela plusieurs méthodes ont été proposées : elles reposent sur un principe commun, qui consiste à échelonner dans le temps des prélèvements dans le milieu réactionnel, afin d'y doser la quantité d'oxydant qui n'a pas réagi.

Dans le cas où l'on utilise l'eau oxygénée, on peut ajouter une quantité connue et en excès, de permanganate de potassium, puis une quantité équivalente de sulfate ferreux titré, dont l'excès est à son tour dosé par le permanganate de potassium (TAGHAVI 1938).

On peut aussi titrer directement l'eau oxygénée résiduelle par iodométrie. En milieu acide minéral, et en présence d'iodure de potassium, l'iode est libéré par l'eau oxygénée, puis titré par le thiosulfate de sodium (BURCKARD 1963).

Le dosage est meilleur si l'on élimine d'abord l'excès d'amine n'ayant pas encore réagi, à l'aide d'un solvant approprié comme le benzène, puis si l'on titre directement l'eau oxygénée par le permanganate de potassium (ACHER 1964).

c) Mécanisme réactionnel : L'oxydation des composés azotés peut procéder soit d'un mécanisme radicalaire, soit d'un mécanisme ionique :

- l'action des peroxydes (peroxyde de benzoyle, par exemple) produit une réaction radicalaire, accompagnée d'une scission homolytique en radicaux libres, en milieu non ionisant, catalysée par les rayonnements ultra-violet.

- l'action de l'eau oxygénée, catalysée par le tungstate de sodium, est une réaction ionique, où la liaison covalente de l'oxydant subit une scission hétérolytique en ions positifs et négatifs, sensible à l'ionisation du milieu, donc à son pH, et à la nature plus ou moins polaire du solvant (BURCKARD 1963).

d) Divers oxydants utilisés : Le phénomène de N-oxydation sur les substances azotées dont la structure se prête à ce type de réaction (cf. paragraphe a), peut avoir lieu sous l'effet de l'eau oxygénée principalement ou bien de divers agents oxydants organiques ou minéraux. Il peut également découler de réactions plus particulières, que nous étudierons à la suite des premières.

= Eau oxygénée, sans catalyseur : cette méthode fut très utilisée, car en plus de ses propriétés oxydantes puissantes, l'eau oxygénée possède l'avantage d'être pratiquement totalement éliminable du milieu réactionnel, par simple distillation sous pression réduite.

Les amines à oxyder sont mises en présence d'eau oxygénée diluée, directement si la solubilisation dans l'eau est possible, sinon en ayant recours à un solvant organique, qui devra être choisi avec attention. En effet, tous ne conviennent pas : ainsi la pyridine solubilise bien les amines, mais se transforme facilement en N-Oxyde; le dioxanne, qui est en lui-même un bon solvant pour les amines, mis en présence d'eau oxygénée, engendre des peroxydes instables et explosifs (ACHER 1964).

On a souvent recours à des acides organiques comme l'acide acétique, qui a l'avantage d'être un solvant commun à l'amine et au N-Oxyde, en général, permettant une réaction en milieu homogène, et par conséquent un meilleur rendement. Ces acides ont l'inconvénient de salifier, voire même de détruire certains groupements fragiles. Ils restent cependant très utiles, notamment dans le cas des cycles azotés (CULVENOR 1953).

La réaction peut être réalisée soit avec une eau oxygénée de titre élevé (100 volumes), qui risque d'hydrolyser des fonctions fragiles, soit avec une eau oxygénée plus diluée (10 volumes), auquel cas la réaction est plus lente. Généralement, on préfère la solution à 100 volumes, qui donne une réaction plus rapide, bien que plus brutale parfois.

La température peut aussi varier entre 25° C et 70° C : on ne dépasse pas ces températures extrêmes car, à froid la réaction serait trop lente, et à plus de 70° C on risquerait de décomposer l'eau oxygénée, perdant ainsi le bénéfice de son action oxydante. La réaction est d'ailleurs souvent exothermique à son début, et c'est pourquoi, avant d'augmenter progressivement la température, on aura soin dans un premier temps de refroidir le milieu réactionnel.

Afin de ralentir la décomposition de l'eau oxygénée, certains auteurs ont proposé l'addition de Trilon B (acide éthylène diaminotétracétique, sous forme de sel sodique), comme stabilisateur dans le milieu (LEBEDEV 1960, BURCKARD 1963). Sur ce principe de réaction, on a pu obtenir entre autres, les N-Oxydes de triméthylamine, diméthylaniline, et méthylaniline.

= Eau oxygénée en présence de catalyseur : afin d'augmenter la vitesse de réaction, et de diminuer la température, l'emploi de catalyseurs a été proposé. Ce sont le tungstate de sodium (LEBEDEV 1960), et les oxydes de métaux de transition des groupes V_B et VI_B (SHENG 1967).

En ce qui concerne le mode d'action de l'eau oxygénée en présence de tungstate de sodium, on présume qu'il se formerait un pertungstate, qui serait l'agent d'oxydation effectif (BURCKARD 1963).

Les acides benzoïque, tartrique, phtalique, peuvent également jouer le rôle de catalyseurs dans l'oxydation de la pyridine par l'eau oxygénée, et on présume qu'ils se transforment en peracides in-situ (CULVENOR 1953).

= Oxydants minéraux : parmi ceux-ci, nous citerons l'acide monopersulfurique de Caro (CLEMO 1938), l'ozone (STRECKER 1920 et 1921), qui risque de donner naissance à des produits explosifs, et enfin le permanganate de potassium et le bioxyde de manganèse (BURCKARD 1963).

= Oxydants organiques :

- les peracides perbenzoïque, peracétique et monoperphtalique, ont été utilisés (CULVENOR 1953), ainsi que

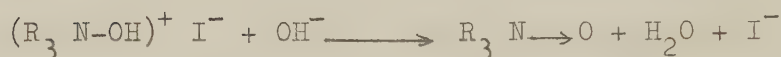
- les hydroperoxydes de tertibutyle, d'amylène, de cumène, en présence de composés du Vanadium comme catalyseur (SHENG 1967).

- le peroxyde de benzoyle (BURCKARD 1963).

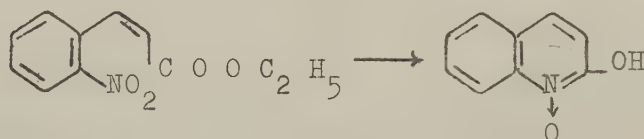
- l'éther éthylique ordinaire, qui contient un taux appréciable d'hydroperoxydes, peut oxyder certains alcaloïdes fragiles comme la spartéine (Pr. CHAMBON, 1957).

= Modes de synthèse particuliers : outre les méthodes simples, dont le principe consiste en une oxydation directe de substances azotées appropriées, il existe d'autres méthodes, plus complexes, permettant de fabriquer des composés N-oxydés. Parmi celles-ci nous en citerons trois :

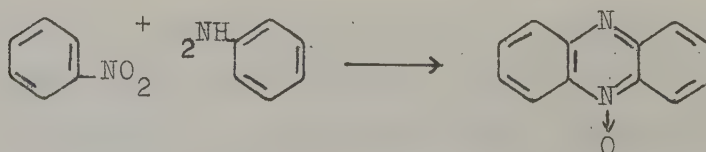
1. A partir d'halogénures d'alcoyle et d'oximes ou d'hydroxylamines (DUNSTAN et GOULDING 1894).



2. Par cyclisation de dérivés aromatiques nitrés (réaction de FRIEDLANDER citée par CULVENOR 1953). En présence d'un réducteur comme le sulfure d'ammonium, l'ortho-nitro-cinnamate d'éthyle fournit un N-Oxyde de carbo-styrile :



3. Par condensation du nitrobenzène avec l'aniline, à chaud, en présence d'hydroxyde de potassium pulvérisé, on obtient un N-Oxyde de phénazine (réaction de WOHL et AUE, citée par CULVENOR 1953) :



e) Purification des N-Oxydes ainsi obtenus : Les différentes méthodes de synthèse décrites, peuvent donner lieu à des produits intermédiaires, c'est pourquoi il faut procéder à la purification des N-oxydes synthétisés. Pour cela il faut éliminer les produits de la réaction qui viennent se mêler au N-Oxyde : ce sont, en particulier, l'eau oxygénée en excès, le solvant, et l'amine de départ qui n'aura pas réagi.

Par distillation sous vide, on élimine par exemple la majeure partie de l'acide acétique, et l'excès d'amine volatile.

On se débarrasse des perhydrates formés (OSWALD 1963) et de l'eau oxygénée, au moyen du bioxyde de manganèse, ou de mousse de platine (CULVENOR 1953), ou de **palladium à 5 %** sur charbon (STEVENS 1958).

On obtient une masse, souvent cristalline, que l'on purifie en la dissolvant dans un solvant approprié, puis en lui faisant subir des cristallisations successives dans un autre solvant. Ainsi le N-Oxyde de l'acide iso-nicotinique est recristallisé dans l'eau (VON EULER 1959 a); le N-Oxyde d'acide nicotinique est lavé dans le méthanol et recristallisé dans l'eau (CLEMON 1949, VON EULER 1958 d); le N-Oxyde d'adénine est lavé et recristallisé dans l'acide acétique (VON EULER 1958 c).

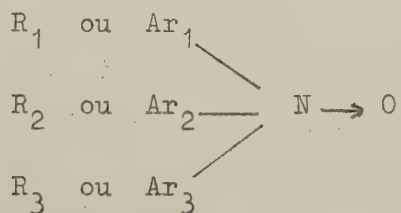
La purification peut être utilement complétée par électrophorèse et surtout par chromatographie.

III - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

a) Etat physique : Les N-Oxydes sont des corps généralement solides, incolores ou blancs, cristallisés, très avides d'eau. Il est difficile de les obtenir anhydres (CULVENOR 1953).

Ils sont d'autant plus hygroscopiques et solubles dans l'eau, que l'amine du départ était plus hydrosoluble (POLONOVSKI 1926).

Leurs points de fusion et d'ébullition sont, en règle générale, supérieurs à ceux de l'amine de départ (TAGHAVI 1938), ce qui s'explique sans doute par leur caractère salin, dû à l'existence de la liaison semi-polaire N - O dans leur molécule :



R = radical aliphatique

A = hétérocycle

B = hétérocycle

Ar = radical aromatique

azoté,

azoté,

type pipéridine

type pyridine

Ils sont en général solubles dans l'eau (plus que la base initiale), dans l'éthanol et le méthanol. Certains N-Oxydes sont même solubles dans des solvants moins polaires tels que le chloroforme (cas du N-Oxyde de chlorpromazine cité par WARREN 1967), le dichloréthane (cas du N-Oxyde d'imipramine cité par FISHMAN 1962 b), le n-butanol et l'éther éthylique (cas du N-Oxyde de chlorpromazine cité par BECKETT 1967). Cependant, dans l'ensemble, ils sont peu solubles dans les solvants organiques non polaires (ACHER 1964).

Les N-Oxydes conservent des propriétés basiques : celles-ci sont toutefois très inférieures à celles de l'amine de départ si elle est aliphatique; mais dans le cas des amines aromatiques, la basicité n'est que légèrement affectée (CULVENOR 1953).

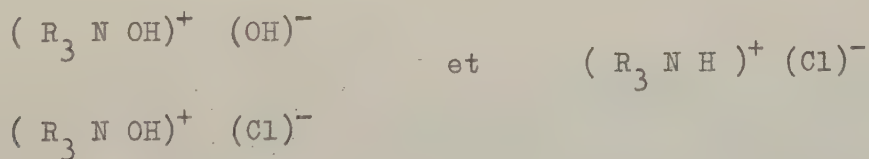
Le moment dipolaire de la liaison N - O est élevé : il est supérieur à celui de la liaison P - O (le phosphore étant l'élément suivant l'azote dans le groupe III^b du tableau périodique de MENDELEEV).

L'ionisation se réalise sous forme $N^+ - O^-$, par conséquent l'oxygène peut capter un proton : c'est ce qui explique la formation de sels, lorsqu'on traite les N-Oxydes par un acide fort (BURCKARD 1963, ACHER 1964).

b) Spectre Ultra-Violet : dans le but de confirmer la constitution des N-Oxydes, les auteurs ont été amenés à étudier leurs spectres d'absorption dans l'ultra-violet et dans l'infra-rouge.

Les composés N-Oxydes absorbent dans la région ultra-violette du spectre. Par rapport au composé azoté initial, le maximum d'absorption subit généralement un léger déplacement hypsochrome (c'est-à-dire vers les courtes longueurs d'onde). De plus on note un effet hyperchrome (c'est-à-dire que le coefficient d'absorption augmente, à cette même longueur d'onde) pour les N-Oxydes comparés à la base de départ.

Dans le cas des N-Oxydes aliphatiques, le déplacement est souvent minime, ce qui, d'après CULVENOR (1953), laisserait penser que le chlorhydrate et l'hydrate de N-Oxyde se présentent sous ~~des~~ structures analogues à celle du chlorhydrate de l'amine :



En 1934, BRUSTIER a étudié le spectre U.V. de divers N-Oxydes d'alcaloïdes. En ce qui concerne les N-Oxydes de purines, STEVENS (1958), a réalisé une étude assez approfondie de leur comportement dans l'ultra-violet; et de même WARREN (1967) pour les métabolites de la chlorpromazine, parmi lesquels le dérivé N-Oxyde.

c) Spectre Infra-Rouge : Les composés aliphatiques N-Oxydes présentent une importante bande d'absorption vers 950 cm^{-1} , due à la vibration de valence de la liaison N - O. Pour les composés N-Oxydes aromatiques ou hétérocycliques, cette bande se trouve entre 1075 et 1350 cm^{-1} . Néanmoins ces bandes ne sont pas toujours faciles à déceler, comme c'est le cas pour les N-Oxydes de phénazines (CULVENOR 1953).

Une étude intéressante a été réalisée par WILEY (1957), concernant la spectrographie I.R. des N-Oxydes pyridiniques et pyrimidiques.

Ces techniques ont également permis l'identification de composés N-Oxydes parmi les métabolites du Schradan (octa-méthyl-phosphoramide) par CASIDA (1954), et parmi les métabolites de la chlorpromazine, par WARREN (1967).

d) Analyse élémentaire : Celle-ci apporte des informations très précieuses pour autant que l'on puisse opérer avec des molécules anhydres, et déterminer précisément la part qui revient à l'oxygène de constitution. En effet, de nombreux auteurs accordent une grande importance à cette méthode, qui représente, en fin de compte, un des moyens les plus sûrs de mettre en évidence la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire dans la molécule de N-Oxyde, comparée à la substance azotée dont elle est issue (STEVENS 1958, STAHPMAN 1946, VON EULER 1958 c).

e) Réactions chimiques diverses, réactions colorées : sous l'action des acides halogénés ou des halogénures d'alcyle, les N-Oxydes forment des sels, souvent bien cristallisés. Ainsi avec l'acide iodhydrique, il se formerait un composé insoluble par action sur certains "généralcaloïdes" (TAGHAVI 1938).

L'acide perchlorique ainsi que l'acide picrique et l'acide chloro-platinique, donnent des précipités avec les N-Oxydes (POLONOVSKI 1930, TAGHAVI 1938). Les picrates ainsi formés permettent de prendre un nouveau point de fusion, contribuant ainsi à l'identification du N-Oxyde.

Pour cela, on dissout environ 0,5 g de N-Oxyde dans 10 ml d'éthanol à 95° (on filtre éventuellement, si nécessaire), puis on ajoute 10 ml d'une solution saturée d'acide picrique dans l'éthanol, et on porte à ébullition, puis on laisse refroidir doucement. On filtre le précipité et on le fait recristalliser plusieurs fois dans l'éthanol.

L'anhydride sulfureux donne différents composés d'addition avec les N-Oxydes (POLONOVSKI 1930).

Les réactions colorées que l'on peut obtenir ne sont pas caractéristiques des N-Oxydes, mais souvent du composé initial non oxydé (cas de la diazo-réaction obtenue aussi bien avec la nicotinamide qu'avec son N-Oxyde : BONAVITA 1961). Par contre le même auteur constate que la réaction de KÖNIG (1904) au bromure de cyanogène, qui doit s'accompagner de la fixation de ce réactif sur l'atome d'azote pyridinique et se poursuivre par l'ouverture du cycle en milieu alcalin, n'a pas lieu avec le N-Oxyde de nicotinamide. Toutefois l'auteur n'en donne pas la raison, qui tient vraisemblablement au fait que l'azote pyridinique se trouve bloqué par l'oxygène qui lui est fixé, dans le N-Oxyde de nicotinamide.

Une réaction particulière aux N-Oxydes pyridiniques, est la formation de cristal violet et de méthyl violet, lorsqu'on les chauffe avec la diméthylaniline en milieu chlorhydrique (COATS 1959).

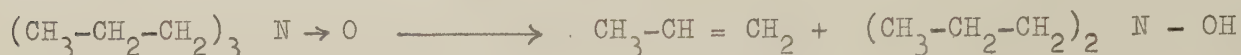
f) Comportement thermique : La stabilité des N-Oxydes est variable avec leur nature chimique. Souvent on observe qu'ils se décomposent au voisinage de leur point de fusion, qu'il est par suite difficile de repérer de façon nette.

On pourra obtenir par chauffage :

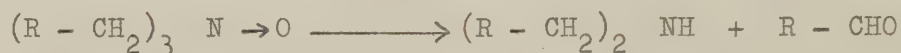
- soit une hydroxylamine substituée : c'est ce que l'on observe par réarrangement de l'allyl-phényl-méthyl-N-Oxyde (ACHER 1964) :



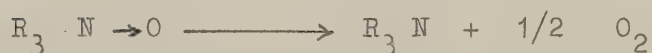
- soit une scission en oléfine et hydroxylamine : c'est la réaction de COPE (1949). Ainsi avec le tripropyl-N-Oxyde à chaud, on obtient du propylène et la dipropyl-hydroxylamine :



- soit une amine secondaire et un aldéhyde : c'est ce que l'on observe en chauffant à 38° C, en présence de nitrate ferrique et d'acide oxalique, le N-Oxyde de diméthyltryptamine (FISH 1955) :



- soit l'amine de départ, avec libération d'oxygène (GRIGNARD 1941) :



g) Chromatographie : en utilisant des solvants plus ou moins acides ou basiques, et en chromatographiant sur papier Whatman ou sur couches minces d'alumine ou de silice, on arrive à séparer les N-Oxydes des amines de départ, par leurs différences de Rf.

Ce phénomène s'accroît encore, d'après MUNIER (1953) lorsqu'on utilise du papier pré-imprégné de tampon phosphate et séché. D'une façon générale, on note que les N-Oxydes ont des Rf inférieurs aux composés azotés de départ.

A titre d'exemple, pour séparer l'adénine de son N-Oxyde, VON EULER (1959 d et 1959a), utilise soit du n-butanol saturé d'eau, soit un mélange de n-butanol, acide formique et eau (77:10:13), qui lui donnent respectivement des Rf de 0,46 et 0,27, ou de 0,79 et 0,57, pour l'adénine et pour son N-Oxyde.

Un autre exemple est fourni par la séparation de l'imipramine et de son N-Oxyde, avec le mélange : benzène, acide acétique, eau (2:2:1), qui donne des Rf de 0,70 et 0,57 respectivement (FISHMAN 1962 b).

h) Réduction des N-Oxydes : Il apparaît que la constitution de ces N-Oxydes peut être confirmée par une réduction, permettant le retour à la molécule azotée initiale. Cette réaction est plus ou moins facile suivant la molécule envisagée, et peut être obtenue en faisant appel, soit à l'hydrogénation directe, soit à divers agents réducteurs, tels que les chlorures d'étain, de titane ou de phosphore, par exemple.

= Réduction par l'hydrogène : les N-Oxydes de pyridine et de quinoléine sont stables en présence d'hydrogène, à température et pression ordinaires. La réduction ne devient efficace, que si l'on opère en présence de Nickel de RANEY, en milieu acide et anhydride acétique pour les N-Oxydes pyridiniques (JERCHEL 1958), ou en milieu ammoniacal pour les N-Oxydes puriques (STEVENS 1958).

Le platine, le palladium, l'oxyde de platine en présence de méthanol, peuvent également servir de catalyseurs (JERCHEL 1958 a et b).

Par ailleurs, on peut avoir recours à l'hydrogène naissant, obtenu avec du zinc en milieu chlorhydrique, ou avec du fer en milieu acétique (JERCHEL 1958 a et b).

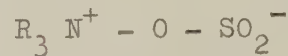
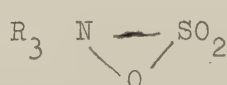
= Réduction par le chlorure stanneux en milieu chlorhydrique : Sur ce principe est basée une méthode de dosage des N-Oxydes, transformés ainsi en l'amine de départ, que l'on titre par l'alun ferrique en présence d'indigo trisulfonate de potassium (GLYNN 1947).

= Réduction par le chlorure de titane en milieu chlorhydrique : Cette réaction peut servir au dosage des N-Oxydes si l'on prend soin de titrer l'excès de $TiCl_3$ par l'alun ferrique en présence de thiocyanate d'ammonium (BROOKS 1959).

= Réduction par l'iodure de potassium en milieu acide : Il se forme de l'iode libre, qui peut être titré par du thiosulfate de sodium (HOEFT 1963). Selon l'auteur, si l'on opère en milieu chlorhydrique, la libération d'iode est due uniquement aux traces d'eau oxygénée accompagnant le N-Oxyde; tandis qu'en présence d'un acide organique comme l'acide acétique,

l'iode libéré provient à la fois de l'action oxydante de l'eau oxygénée et de celle du N-Oxyde.

= Réduction par l'anhydride sulfureux : dans un premier temps, il se forme des composés d'addition peu solubles dans l'eau, qui pourront ensuite être hydrolysés en amine tertiaire et acide sulfurique (réaction de LECHER, citée par CULVENOR 1953). Plusieurs formules ont été proposées :



La deuxième structure semble la plus probable. Cependant en ce qui concerne le triméthylamine N-Oxyde (TMAO), en solution benzénique, traité par SO_2 , il donne naissance à 95 % de la troisième forme, et à 5 % seulement de la deuxième. On sépare les deux isomères dans l'eau : ce dernier en effet est peu soluble et stable, contrairement au précédent. Leurs produits d'hydrolyse sont différents : diméthylamine, formaldéhyde et acide sulfurique pour l'un, triméthylamine et acide sulfurique pour l'autre.

Les composés aromatiques ou hétérocycliques azotés, donnent des combinaisons très stables, difficiles à hydrolyser. Ainsi, selon OCHIAI (1943), il est impossible de réduire les N-Oxydes de pyridine ou de quino-
léine par l'acide sulfureux, ces composés ayant une "pression de réduction" trop élevée.

= Réduction par divers composés soufrés : le sulfure d'ammonium (ACHER 1964), l'hydrosulfite de sodium en présence d'alcool dilué (NEWBOLD 1948), le chlorure de thionyle (VON EULER 1959 d), les thiols représentés par le monothioglycol (ACHER 1964), et le naphthalène-thiol (OSWALD 1963). Tous les réducteurs cités ont été appliqués à des cas particuliers.

= Réduction par le trichlorure de phosphore en milieu chloroformé : On a pu réduire ainsi le 4-nitropyridine N-Oxyde, en une heure, à une température de 80° C (JERCHEL 1958). L'effet réducteur du trichlorure de phosphore peut aussi s'exercer en milieu aqueux, à chaud, pour les N-Oxydes d'acide nicotinique et de nicotinamide (VON EULER 1959 d).

= Réduction par le plomb en présence d'oxalate ferreux : On a pu réduire ainsi des aminopyridines N-Oxydes, pour lesquelles la méthode au trichlorure de phosphore était inapplicable (ABRAMOVITCH 1961).

= Action des réducteurs biologiques : L'acide ascorbique en présence de traces de fer et à la lumière, peut réduire certains N-Oxydes (VON EULER 1959 c). La platiphylline et la séneciphylline peuvent être ainsi réduites (CULVENOR 1953).

On peut également avoir recours à des enzymes bactériennes (CASTELL 1951) ou à des levures (TOMITA 1944), en ce qui concerne le TMAO, ainsi qu'à des enzymes extraites des microsomes de foie de porc (MURRAY 1966. b) pour le N-Oxyde de nicotinamide.

i) Dosage des N-Oxydes : Celui-ci peut se réaliser en appliquant certaines méthodes volumétriques, basées sur la réduction par $TiCl_3$ (BROOKS 1959), par $SnCl_2$ (GLYNN 1947), ou par KI (HOEFT 1963).

On peut également avoir recours à une mesure acidimétrique en milieu anhydre, utilisée en particulier pour le dosage des détergents aminoxydes.

IV - PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

Nous envisagerons successivement l'intérêt thérapeutique des N-Oxydes, puis leur rôle biochimique, et enfin deux exemples de métabolites N-oxydés connus à l'heure actuelle.

a) Intérêt thérapeutique : En 1917 POLONOVSKI constata que la N-oxydation d'un alcaloïde comme l'ésérine, telle qu'elle paraissait se présenter à l'état naturel dans la fève de Calabar, et qui lui valut son nom de "génésérine", lui faisait perdre une partie de sa toxicité, sans entraver son activité, ce qui ouvrait la voie à d'intéressantes applications thérapeutiques dans le domaine des alcaloïdes, sous le vocable de "généalcaloïdes" (POLONOVSKI 1925, 1926, 1930, 1936, ANGELETTI 1932, LOBSTEIN 1935).

Cependant, selon d'autres auteurs, ces généalcaloïdes perdraient en même temps une partie de leur activité (GIELDANOVSKI 1965).

Si l'on considère l'existence d'un atome d'azote pentavalent dans ces N-Oxydes d'alcaloïdes, on peut alors rapprocher de la strychnine N-Oxyde, les sels d'ammonium que sont les strychniums, découverts par HAZARD (1957), et dont les toxicités sont respectivement 50 fois et 12 fois inférieures à celle de la strychnine elle-même.

Les N-Oxydes de diazines, comme l'acide aspergillique, possèdent des propriétés antibactériennes puissantes in-vitro. Toutefois elles sont inutilisables in-vivo, du fait de leur haute toxicité (CULVENOR 1953).

D'autres composés comme les "moutardes à l'azote", ont gagné un renouveau d'intérêt sous leur forme N-Oxydée, qui est 10 fois moins toxique et non vésicante. Ces composés furent synthétisés par STAHRMAN (1946) et par COLUMBIC (1946), puis appliqués au traitement du sarcome de Yoshida, par ISHIDATE (1951). Ce dernier a pu obtenir 25 % de guérison de cette maladie chez le rat, et une durée de survie double ou triple pour les 75 % restant.

Ainsi le Nitromin (qui est le méthyl-bis (2-chloréthyl) amine N-Oxyde) appelé plus couramment N-Oxyde Lost par VON EULER (1958, d), administré à la souris, par voie intrapéritonéale, possède une DL 50 qui se situe entre 75 et 125 mg par kg, au lieu de 2,4 mg/kg pour l'homologue non oxydé.

Alors que l'intérêt des premiers N-Oxydes était surtout axé sur une diminution de toxicité, VON EULER (1958, a) fut le premier à envisager leur rôle possible comme anti-métabolites dans les cellules cancéreuses. Cet auteur pense que le Nitromin, précédemment cité, serait une "forme de transport", pratiquement inerte, capable de libérer la "forme réduite", active in-situ dans l'organisme. Il suggère par ailleurs, que le Nitromin pourrait libérer de l'eau oxygénée dans l'organisme, favorisant ainsi la biosynthèse d'autres N-Oxydes, ayant un rôle métabolique éventuel (VON EULER 1958, c).

C'est ainsi que VON EULER (1958, a) a constaté que le taux d'histidine augmentait dans les tissus en voie de prolifération. Or l'histidine est facilement transformée en N-Oxyde, comme le prouvent des expériences réalisées in-vitro, utilisant de l'eau oxygénée extrêmement diluée, à 0,002 %, recréant ainsi des conditions physiologiques (VON EULER 1958, c). Toutes les protéines renfermant des amino-acides terminaux à noyaux hétérocycliques, comme l'histidine ou le tryptophane, sont ainsi susceptibles d'être N-oxydées.

Finalement, sous l'action des N-Oxydes de moutardes azotées, il se formerait dans l'organisme des amino-acides et des protéines N-Oxydés, qui pourraient jouer un rôle d'anti-métabolite, freinant par là-même le développement anarchique des tissus cancérisés.

On peut rapprocher de ces travaux, ceux de HALEY (1962), concernant l'effet radioprotecteur comparé, de divers composés antimalariques ou de dérivés nicotiniques, et de leurs N-Oxydes, chez la souris. Ces composés sont actifs, mais moins cependant que la mercapto-éthylamine qui servait de référence à ces mesures.

Par ailleurs, envisageant leur rôle possible dans les co-enzymes nicotiniques (cozymase ou NAD) et flaviniques (FAD), qui participent à l'équilibre d'oxydo-réduction de l'organisme, VON EULER (1958, a), s'est également intéressé aux N-Oxydes de nicotinamide et d'adénine.

L'auteur a pu montrer (1958, c) que, in-vitro, mais dans des conditions pratiquement physiologiques, on pouvait oxyder l'adénine en N-Oxyde, par action d'eau oxygénée à 0,002 %. L'oxydation des acides nucléiques, conduit d'abord à des poly-N-Oxydes, à caractère hydrosoluble accru, dont l'hydrolyse libère le N-Oxyde d'adénine (VON EULER 1959, d).

De son côté, la nicotinamide s'est révélée assez facilement transformable en N-Oxyde, in-vitro, sous l'action des microsomes de foie de porc (CHAYKIN 1959).

L'existence possible des N-Oxydes d'adénine et de nicotinamide, principaux constituants de la cozymase, laisse présager un rôle biologique pour d'autres N-Oxydes, qui se formeraient in-situ dans l'organisme, et participeraient à l'équilibre red-ox (VON EULER 1959 a). A ce propos, il est intéressant de noter que, dans les cellules normales, la cozymase se trouve surtout sous forme oxydée, contrairement à ce que l'on constate dans les cellules cancérisées (VON EULER 1958, a). Ceci justifierait peut-être le rôle d'anti-métabolite attribué au N-Oxyde d'adénine par BROWN (1959).

En ce qui concerne les propriétés vitaminiques des N-Oxydes nicotiniques, les auteurs ne semblent pas d'accord. En 1961, les travaux de HIRAOKA mettaient en évidence l'inefficacité vitaminique des N-Oxydes de nicotinamide et d'acide nicotinique, à la suite d'essais réalisés sur des souches de "Lactobacillus" et de "Staphylococcus aureus", qui sont dépendantes vis-à-vis de la vitamine PP.

Plus récemment, DI ROSA (1965), a montré que le N-Oxyde d'acide nicotinique était utilisable par des bactéries dépendantes de l'acide nicotinique.

Du point de vue pharmacologique, on a attribué récemment des propriétés inhibitrices de la mono-amine-oxydase, au N-Oxyde de nicotinamide, à la suite de mesures manométriques effectuées in-vitro, sur des mitochondries cérébrales de rat (NANTKA-NAMIRSKI 1966).

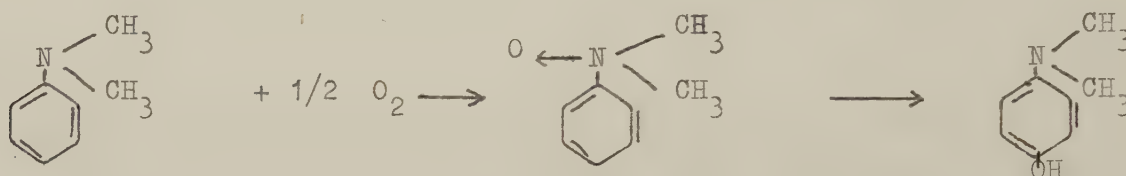
Parmi les autres composés N-oxydés, à usage thérapeutique, on peut citer :

- le "dioxy-pyramidon", moins toxique et plus soluble dans l'eau, mais dont l'auteur n'est pas absolument certain qu'il s'agisse d'un N-Oxyde (CHARONNAT 1929).
- les N-Oxydes de Novocaïne et de Pantocaïne (LAUER 1934).
- le N-Oxyde de Bénadryl, qui conserve ses propriétés antihistaminiques, tout en étant moins toxique de 50 % à 800 %, selon qu'il est administré par voie orale ou parentérale, chez la souris (GIELDANOVSKI 1965).
- ce même composé a pu être utilisé avec satisfaction, sous forme de camphosulfonate, chez l'homme, où l'on constate une toxicité aiguë, cinq à six fois moindre (PERNIN 1963).
- les N-Oxydes de tétramines tertiaires, à propriétés curarimimétiques et moins toxiques, synthétisés par HAZARD (1956).
- par contre le N-Oxyde d'adiphénine semble perdre à la fois sa toxicité et son pouvoir thérapeutique (PATKOVSKI 1966).
- parmi les tranquillisants de la série des benzodiazépines, signalons le Librium, qui renferme un groupement N-Oxyde.
- on a signalé récemment un nouveau médicament anti-silicosisique, qui serait un haut polymère du type polyvinyl pyridine N-Oxyde (FERRUTTI 1966).
- enfin, il faut tout de même remarquer que, dans de rares cas, la fonction N-Oxyde apporte un surcroît de toxicité (GIELDANOVSKI 1965). C'est ce que l'on constate dans certains composés bactériostatiques dérivés de la quinoxaline, ou dans des antihistaminiques dérivant de la dibenzylpipérazine.

b) Rôle biochimique des N-Oxydes : Nous étudierons l'un après l'autre, le rôle des N-Oxydes dans les transpositions fonctionnelles, puis dans les mécanismes de désalcoylation oxydative.

1. Transposition fonctionnelle :

Dès 1907, HILDEBRANDT (cité par WILLIAMS 1959), étudiant le métabolisme de la diméthylaniline chez le lapin, retrouvait partiellement ce composé dans les urines sous forme de p-diméthyl-aminophénol. Il suggérait déjà un réarrangement de la molécule, par la voie d'un N-Oxyde :

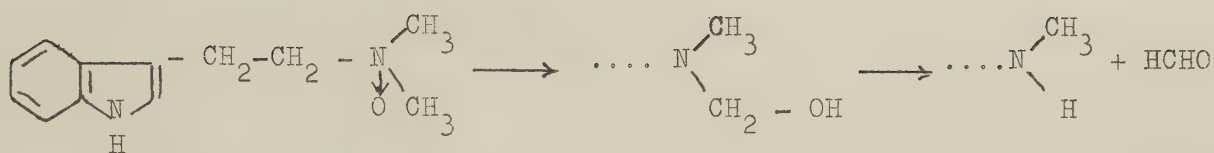


Cependant, en 1936 HORN (cité par WILLIAMS 1959), reprenant ces travaux, ne put réussir à isoler le N-Oxyde chez l'animal; par contre, l'ayant synthétisé in-vitro, l'auteur put administrer le N-Oxyde à l'animal, et retrouva les mêmes métabolites qu'avec la diméthylaniline elle-même.

Il fit ensuite des expériences analogues sur la diéthylaniline et sur son N-Oxyde : le premier seulement est éliminé sous forme de para-diéthyl-aminophénol, le second sous forme inchangée, chez le chien et chez le lapin. Il était alors assez difficile de conclure quant au rôle réellement joué par le N-Oxyde au cours de ces transformations.

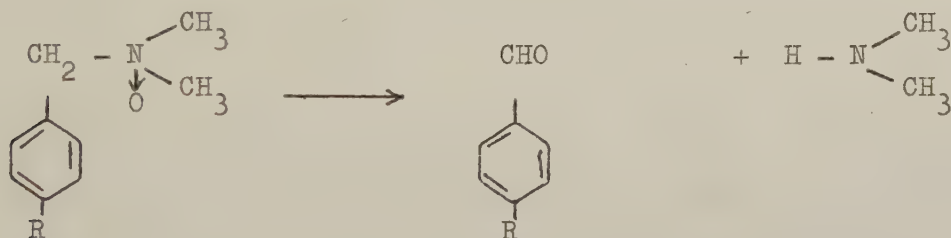
2. Désalcoylation oxydative :

La question se posa une vingtaine d'années plus tard, lorsque FISH (1955), réussit à montrer que le N-Oxyde de diméthyl-tryptamine, substance naturelle isolée à partir des graines de "Piptadenia", chauffé en milieu acide, en présence d'ions ferriques, subissait un réarrangement, suivi d'une déméthylation, avec libération de formaldéhyde :



Les produits de la réaction étaient isolés et identifiés par chromatographie et par électrophorèse.

La même réaction aurait lieu avec le N-Oxyde d'hordénine (FISH 1956, b), le N-Oxyde de nicotine (CRAIG 1964 b), les N-Oxydes de benzyl-diméthylamine (CRAIG 1964, a), et les N-Oxydes de diméthyl-tryptophane et de diméthyl-glycine (FISH 1956 a, SWEeley 1957). En ce qui concerne les N-Oxydes de benzyl-diméthylamine substitués, ils peuvent, de plus, suivre une autre voie de réarrangement, conduisant à la formation de benzaldéhydes substitués et de diméthylamine :



Les aldéhydes formés sont identifiés à l'état de 2-4-dinitro-phénylhydrazones, que l'on étudie par chromatographie en couches minces, et par spectrographie dans l'ultra-violet.

Dans la série aliphatique, le réarrangement a lieu également, en milieu acide et en présence d'ions ferriques : ainsi le N-Oxyde de triméthylamine (TMAO) donne naissance à la diméthylamine et à l'aldéhyde formique (CRAIG 1961) :



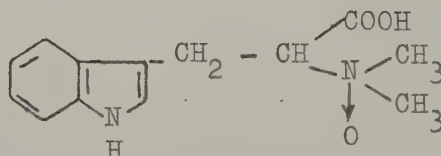
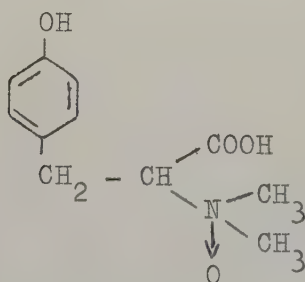
Cette même réaction fut étudiée par FERRIS (1967), en se plaçant du point de vue de la détoxification possible des amines tertiaires. L'auteur montre que ce sont en réalité les ions ferreux qui agissent comme catalyseurs :

ceux-ci sont produits par chauffage de l'acide oxalique avec les ions ferriques. Puis à leur tour, ceux-ci vont réduire TMAO en TMA, libérant des ions ferriques, qui vont permettre, après hydrolyse, la libération de diméthylamine et d'aldéhyde formique. Ces divers produits ont en effet pu être mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse.

Le mécanisme de cette réaction est radicalaire, comme le prouve la polymérisation observée sur le méthacrylate de méthyle, ajouté dans le milieu. En effet, cette réaction de polymérisation, qui est elle-même radicalaire, a besoin d'un initiateur, qu'elle trouve dans le milieu sous la forme des radicaux libres provenant de TMAO.

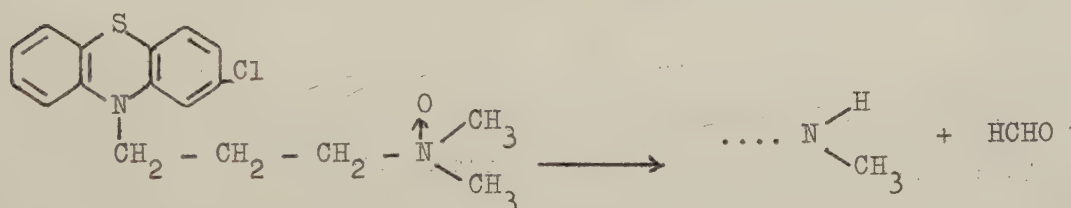
Le système enzymatique, localisé dans la fraction microsomale des cellules hépatiques, responsable de la détoxification des amines, semble posséder toutes les caractéristiques ci-dessus énumérées comme nécessaires à la réaction in-vitro. Ce qui n'est pas absolument certain, c'est la nécessité d'un N-Oxyde comme forme intermédiaire dans la désalcoylation des amines (FERRIS 1967).

Considérant toujours l'aspect biologique, du point de vue de la détoxification des amines tertiaires, FISH (1956, a), donna suite à ses premiers travaux sur le réarrangement des N-Oxydes en milieu acide, en présence d'ions ferriques, en faisant agir des homogénats de foie de rat sur le N-Oxyde de diméthyl-tryptamine : il obtint, comme précédemment, un réarrangement sous forme N-hydroxyméthylée, suivi d'une désalcoylation, produisant l'amine secondaire correspondante et l'aldéhyde formique. Il obtint des résultats analogues avec les N-Oxydes de diméthyl-tyrosine et de diméthyl-tryptophane :



En 1955, TSUYUKI proposait un mécanisme tout à fait identique pour le Schradan (octa-méthyl-phosphoramide), qui est effectivement transformé en N-Oxyde in-vivo, et finalement déméthylé.

Puis lorsque FISHMAN (1962, a), découvrit l'existence du N-Oxyde de chlorpromazine dans les urines de malades mentaux, soumis au traitement par cet agent tranquillisant, il constata que, parmi les produits de décomposition de ce N-Oxyde après un séjour de trois mois à l'exsiccateur, on retrouvait de la chlorpromazine et son produit de déméthylation, la Nor₁-chlorpromazine. Ceci était en accord avec les données précédentes, concernant la possibilité d'une déméthylation oxydative :



Travaillant dans la même voie, BECKETT (1967) et HARINATH (1968) ont montré qu'en présence de microsomes de foie de souris et de NADP-H (nicotinamide adénine dinucléotide réduit), la chlorpromazine était transformée en N-Oxyde. De plus, en l'absence de NADP-H, ce N-Oxyde ne subit pas de déméthylation. Cependant, HARINATH (1968), se basant sur le dosage de la quantité de formaldéhyde libérée, observe que la déméthylation en présence de NADP-H est supérieure pour la chlorpromazine, comparée au N-Oxyde de chlorpromazine traité dans les mêmes conditions.

Ceci indiquerait que le N-Oxyde de chlorpromazine ne serait pas un intermédiaire obligatoire dans la déméthylation oxydative. Ces observations semblent en accord avec celles de MAO et TARDREW (1965) selon lesquelles il est douteux que le N-Oxyde d'érythromycine A, soit un intermédiaire dans la désalcoylation oxydative de l'érythromycine A, par les tissus de lapin.

Par ailleurs, reprenant les premiers travaux sur la diméthylaniline dont le N-Oxyde est désalcoylé, in-vitro, par les microsomes de foie de

rat, en présence de NADP-H et d'ions ferriques (UEHLEKE 1966, ZIEGLER 1964 cité par HARINATH 1968), MACHINIST (1966) a pu montrer l'intervention de deux enzymes microsomaux dans ces réactions :

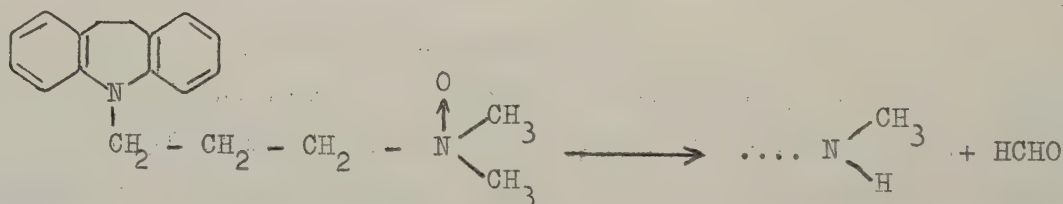
= une N-Oxyde synthétase, qui fixerait l'oxygène moléculaire en présence de NADP-H.

= et une N-Oxyde désalcoylase.

Enfin, il faut mentionner les travaux de BICKEL (1966), qui a pu montrer également la transformation de l'imipramine en N-Oxyde, in-vitro, sous l'action des microsomes hépatiques. Cependant, à la lumière des observations suivantes, l'auteur a pu tirer quelques conclusions :

= au cours de l'incubation de l'imipramine avec le système enzymatique microsomal, le taux de N-Oxyde augmente pendant les deux premières heures, tandis que la desméthyl-imipramine augmentait peu.

= l'incubation d'imipramine N-Oxyde dans les mêmes conditions, ne fournit que très peu de desméthyl-imipramine, et pratiquement aucun autre produit.



Selon l'auteur, comme le N-Oxyde est plus polaire que l'imipramine ou que la desméthyl-imipramine, il n'atteint probablement pas l'enzyme microsomal, qui est entouré d'une barrière lipidique non polaire. Cependant le N-Oxyde reste plus liposoluble que l'hydroxy-imipramine, qui est malgré cela plus rapidement déméthylée par les microsomes. L'auteur conclut à l'existence d'un système enzymatique déméthylant très actif, et d'un système N-Oxydant accessible, ce qui excluerait le N-Oxyde comme produit intermédiaire dans la N-déméthylation.

En conclusion, nous voyons que l'évolution des idées depuis le début du siècle, a conduit les différents auteurs, sinon à exclure, du moins à minimiser le rôle des N-Oxydes comme intermédiaires dans les phénomènes de désalcoylation oxydative des composés azotés tertiaires. Par contre les N-Oxydes subsistent comme formes d'élimination moins toxique.

c) Métabolites N-oxydé connus : Nous avons vu plus haut, que les N-Oxydes étaient moins toxiques que l'amine de départ : il est possible que, dans l'organisme, la N-oxydation joue un rôle direct dans la détoxication, le produit formé étant plus hydrosoluble, ce qui faciliterait son élimination urinaire.

Mise à part l'étude du N-Oxyde de triméthylamine (BAKER 1963), et du N-Oxyde de nicotinamide (CHAYKIN 1959), que nous reverrons ultérieurement plus à fond, d'autres métabolites N-oxydés ont été découverts au cours des dernières années, mais ceux-ci sont encore très rares.

Le Schradan, connu à la fois pour ses propriétés insecticides et pour le traitement de la myasthénie grave, donne lieu à la formation d'un N-Oxyde, in-vivo, chez les mammifères, comme nous avons eu l'occasion de le mentionner au paragraphe précédent. Celui-ci manifeste une activité anticholinestérasique très supérieure au produit de départ, qui pourrait contribuer à la prolongation des effets, souvent observée au cours de l'intoxication chez l'animal (CASIDA 1954, TSUYUKI 1955). Ceci n'est qu'un cas particulier, constituant une exception à la règle selon laquelle les N-Oxydes sont, dans l'ensemble, moins toxiques que le produit azoté dont ils dérivent.

Il faut maintenant rappeler les très intéressants travaux réalisés par FISHMAN chez l'homme, concernant le métabolisme de trois substances assez voisines, la chlorpromazine (1962, a), l'imipramine (1962, b), et la promazine (1964).

Parmi les nombreux métabolites de la chlorpromazine (11 à 14 selon les auteurs), il existe deux N-Oxydes, dont l'un est à la fois un

sulfoxyde (HARINATH 1968, WARREN 1967). Chez l'homme, l'administration de chlorpromazine par voie orale, est suivie d'une élimination urinaire sous forme de N-Oxyde, représentant environ 0,7 % de la dose ingérée, ce qui en fait un métabolite plus important que le sulfoxyde de chlorpromazine (0,4 %), mais inférieur cependant aux produits de déméthylation correspondants, les Nor₁- et Nor₂- chlorpromazine sulfoxydes (FISHMAN 1962, a). Chez le chien, cet auteur trouve un taux de N-Oxyde plus élevé, de l'ordre de 2 % à 3,5 %.

FORREST (1968), a étudié en outre le métabolisme de la chlorpromazine chez le chat et chez le lapin : il a retrouvé également dans ces deux espèces, parmi les métabolites non-conjugués et non-phénoliques, le N-Oxyde de chlorpromazine. Cependant, on ne connaît pas encore très bien les propriétés pharmacologiques de ce composé. Mais FISHMAN (1962, a) suggère la possibilité selon laquelle un métabolite mineur tel que le N-Oxyde de chlorpromazine serait en fait retenu dans l'organisme, contribuant ainsi de façon significative à l'activité biologique de la chlorpromazine.

Des essais réalisés in-vitro, avec des microsomes ou des homogénats de foie de souris, en présence de NADP-H, sur la chlorpromazine, ont montré la formation de N-Oxyde, en quantité plus importante cependant, dans le premier cas, ce qui confirme bien la localisation du système enzymatique N-oxydasique au niveau des microsomes hépatiques (HARINATH 1968, BECKETT 1967 et 1968). Par ailleurs, si les autres métabolites hydroxylés ou aminés sont susceptibles de subir une glycuco-conjugaison (BOLT 1967), ce n'est absolument pas le cas pour le N-Oxyde.

En ce qui concerne l'imipramine, l'administration chez l'homme d'une dose variant entre 150 et 300 mg, par voie orale, entraîne une élimination urinaire de 1,7 % de la dose ingérée, sous forme de N-Oxyde. Il semble que la quantité de ce métabolite retrouvée soit assez constante, et ne dépende pas de la dose administrée (FISHMAN 1962, b). Un autre auteur (HERRMANN 1963), travaillant pourtant avec des doses assez voisines, retrouve un pourcentage de N-Oxyde un peu inférieur, de l'ordre de 0,5 % à 1,5 %, mais ceci tient sans doute aux difficultés d'extraction et à la faible quantité dosée.

Comme dans le cas de la chlorpromazine, des essais réalisés in-vitro, ont permis de montrer la formation de N-Oxyde, après incubation d'imipramine avec un système enzymatique microsomal (BICKEL 1966). Celui-ci est également un métabolite final, ne subissant pas de glycuco-conjugaison. Le N-Oxyde formé in-vitro, représente environ 5 % des métabolites retrouvés par BICKEL (1966), ce qui le classe comme le premier métabolite mineur, les métabolites majeurs étant représentés par la desméthyl-imipramine (45 %) et l'hydroxy-imipramine (10 %), tandis qu'il reste dans le milieu 35 % d'imipramine inchangée.

Le N-Oxyde d'imipramine est très stable, car, en présence d'urine témoin, et conservé au réfrigérateur plusieurs semaines, il demeure inchangé. Le même auteur (FISHMAN 1962, b) a montré qu'il ne s'agissait pas non plus d'un produit d'auto-oxydation, provenant de l'altération de l'imipramine ou d'autres métabolites comme l'hydroxy-imipramine, ce qui fut récemment encore confirmé par BICKEL (1966).

Les travaux de FISHMAN (1964), concernant le N-Oxyde de promazine, sont tout-à-fait analogues aux précédents se rapportant à la chlorpromazine. L'auteur trouve une élimination urinaire d'environ 0,8 % chez l'homme, et de 1,1 % chez le chien, sous forme de N-Oxyde de promazine. Par contre il ne semble pas que la promazine ait donné lieu à une étude in-vitro avec des enzymes microsomaux.

Un autre métabolite N-oxydé fut observé à partir de la diméthylaniline, d'abord in-vitro avec des enzymes hépatiques (ZIEGLER 1964, cité par HARINATH 1968), puis in-vivo chez le chat (UEHLEKE 1966). Ce dernier auteur a également réussi à montrer la transformation enzymatique, in-vitro, du diméthylamino-azobenzène (plus connu sous le nom de Jaune de beurre) en N-Oxyde, manifestant une activité méthémoglobinisante vis-à-vis des suspensions d'hématies de vache. Ceci laisse entrevoir la possibilité d'un phénomène analogue in-vivo, expliquant peut-être les effets nocifs constatés avec ce colorant, dont l'utilisation a été supprimée par la législation.

A titre d'exemple, nous indiquerons maintenant la mise en évidence des deux métabolites N-oxydés, de la chlorpromazine et de l'imipramine, chez l'homme.

1. Détection urinaire du N-Oxyde de chlorpromazine : L'urine est extraite par le dichloréthane, à pH = 11; puis on chromatographie l'extrait sur papier Whatman avec le solvant : benzène-acide acétique-eau (2:2:1). Le N-Oxyde migre avec un $R_f = 0,64$, et se colore en rose par le réactif au persulfate, se prêtant alors à une comparaison visuelle avec des spots témoins, de quantités croissantes, chromatographiés et révélés de la même façon (FISHMAN 1962, a).

On peut aussi extraire l'urine par le chloroforme alcalin, puis chromatographier sur couche mince de Silicagel, avec le solvant : acétate d'éthyle-méthanol-diéthylamine (14:4:5), selon HARINATH (1968).

Un autre auteur, BECKETT (1967), pratique l'extraction de l'urine par l'éther éthylique et par le n-butanol, suivie d'une chromatographie sur couche mince dans divers systèmes, et d'une révélation par l'acide sulfurique dilué au demi. Le spectre U.V. du spot de N-Oxyde de chlorpromazine élué (sans pulvérisation du révélateur), peut également permettre une étude quantitative, en travaillant à 255,5 nm ou à 307,5 nm, correspondant aux maximums d'absorption.

2. Détection urinaire du N-Oxyde d'imipramine : L'urine est extraite par le dichloréthane en milieu alcalin (FISHMAN 1962, b, HERMANN 1963, BICKEL 1966).

Le premier auteur chromatographie l'extrait, soit sur papier Whatman simple avec le solvant : benzène-acide acétique - eau (2:2:1) par voie descendante, soit sur papier traité par l'huile d'arachide à 10 % dans l'acétone et séché avant usage, et emploie alors un solvant à base d'ammoniaque à 58 % et de méthanol (1:1) ou (4:1), par voie ascendante.

La révélation des spots est réalisée à l'aide d'un azo-réactif à base de p-nitraniline, nitrite de sodium et acide sulfanilique en milieu chlorhydrique, qui fournit un spot bleu pour le N-Oxyde d'imipramine. On procède alors à l'élution et on photomètre à 578 nm (BICKEL 1966), ou à 574 nm (HERRMANN 1963).

La révélation des spots peut également se faire avec un mélange de "Fast red salt GG" à 0,4 % dans l'acide chlorhydrique à 4 %, dilué extemporanément au tiers dans l'acétone. On observe également une coloration bleue avec le N-Oxyde, que l'on peut comparer visuellement avec des spots d'une gamme étalon traitée de la même façon. Selon l'auteur (FISHMAN 1962, b), les résultats obtenus sont aussi précis qu'en opérant par photométrie.

Enfin, on peut aussi chromatographier l'extrait urinaire sur couche mince de Silicagel G, avec le solvant : chloroforme-ammoniaque-propanol (100:2:100). L'auteur procède alors à une évaluation semi-quantitative par la méthode de PELKA (1965), basée sur la relation linéaire existant entre le logarithme de la quantité de substance et la racine carrée de la surface du spot.

V - CONCLUSION

Les N-Oxydes, recherchés au début pour la moindre toxicité et la plus grande solubilité dans l'eau, qu'ils peuvent conférer à certains médicaments, facilitant ainsi leur administration en thérapeutique, semblent avoir acquis depuis lors des potentialités nouvelles.

Leur rôle éventuel d'antimétabolite, leur participation aux phénomènes de désalcoylation oxydative - plus ou moins controversé d'ailleurs -, leur possibilité d'entrée dans la constitution d'enzymes d'oxydo-réduction contenant des nucléotides nicotiniques ou flaviniques, et enfin, leur existence dans les urines comme métabolite, généralement moins toxique et plus hydrosoluble, facilement éliminable, sont autant d'aspects nouveaux des N-Oxydes considérés du point de vue physiologique.

C'est ce qui nous a amené à étudier expérimentalement les métabolismes de trois médications azotées, la nicotinamide, la nicéthamide, et enfin le chlorhydrate de tripélennamine.

D'autre part, dans un domaine tout à fait différent, les N-Oxydes aliphatiques à longue chaîne, ont acquis un intérêt industriel considérable, au titre de tensio-actifs, émulsionnants, et détergents, qui s'est manifesté surtout au cours des dernières années, amenant ainsi à reconsidérer leur rôle dans l'hygiène générale.

Ces aspects nouveaux nous ont conduit à étudier de près les aminoxydes tensio-actifs, au cours de notre second travail de thèse.

Deuxième Chapitre

TRIMETHYLAMINE ET TRIMETHYLAMINOXYDE

Première Partie

TRAVAUX ANTERIEURS

SUR LE TRIMETHYLAMINOXYDE

I. INTRODUCTION

DUNSTAN et GOULDING (1894, 1899) synthétisèrent le premier N-Oxyde de la série aliphatique, le triméthylaminoxyde $(\text{CH}_3)_3 \text{NO}$, appelé depuis lors par abréviation TMAO. Mais il fallut encore attendre plusieurs années pour que cette substance soit remise en évidence, à côté de la triméthylamine $(\text{CH}_3)_3 \text{N}$, (TMA), mais cette fois-ci dans un milieu biologique naturel, constitué par de la chair de requin (SUWA 1909). Il devenait alors intéressant de savoir si l'on assistait là à un type d'oxydation général, visant à transformer les produits aminés en dérivés N-Oxydés, comme produits de métabolisme.

II - REPARTITION DU T.M.A.O. CHEZ LES ETRES VIVANTS

De nombreux travaux ont été effectués, d'une façon assez systématique, chez les êtres vivants, en vue d'étudier l'éventuelle formation, puis l'origine et la répartition du TMAO.

A - Chez les mammifères

1) L'homme élimine environ 50 mg de TMAO et 1 mg de TMA par litre d'urine (LINTZEL 1934 b, TARR 1941). Ce taux peut subir des variations dans certains états pathologiques comme le cancer, les affection hépatiques, ou la maladie de Basedow (HINSBERG 1942, DE LA HUERGA 1951, a et b, WRANNE 1956, STRACK 1963). L'ingestion de choline augmenterait l'élimination de TMA (MARONCELLI 1950) et de TMAO urinaires, sous l'influence d'une action oxydante au niveau du foie (LINTZEL 1934, DE LA HUERGA 1951, 1952, 1953). Pour ARDAILLOU (1965), les 2/3 de la choline ingérée se retrouvent transformés en TMAO dans les urines. De même, avec le TMA (TARR 1941, DARGEL 1966), ou à un moindre degré avec la carnitine (STRACK 1963, DARGEL 1966) qui ne provoque une augmentation nette du TMAO que vers le cinquième jour.

2) Chez le chien, par contre, on ne trouve pas d'augmentation notable du TMAO urinaire après administration de choline (FUCHS 1938, MULLER 1940).

3) Chez le chat, IWAMOTO (1957) a montré qu'il fallait injecter des doses massives de TMA par voie I.P. pour obtenir une légère augmentation de TMAO dans les organes et les urines, une heure plus tard.

Par contre, in-vitro, l'auteur a pu montrer que des homogénats de foie de chat, mis en contact avec TMA, provoquaient sa transformation à 50 % en TMAO, au bout de 24 heures.

4) Sur le rat, les travaux ont été plus nombreux. Cet animal n'excrète normalement, dans ses urines, que de très faibles quantités de TMAO, de l'ordre de 3 μ moles par 48 heures (CHIANCONE 1940 et 1944, NORRIS 1945); mais ce chiffre peut être augmenté, et varie suivant que l'on administre à l'animal du chlorhydrate de choline ou de TMA, ou de la bétaine, et suivant le choix de la voie, orale ou intra-péritonéale (NORRIS et BENOIT 1945).

Cette transformation aurait lieu sous l'action des bactéries intestinales. En effet, l'administration de chlorhydrate de TMA ou de choline, per os ou par voie intra-gastrique, à des rats "germ-free", ne modifie pas l'élimination urinaire du TMAO, contrairement à ce que l'on observe simultanément chez des rats témoins normaux (MULLER 1942, PRENTISS 1961). Par contre, l'administration de TMAO à des rats normaux, est suivie d'une élimination partielle sous forme inchangée (59 %), et sous forme de TMA (3,5 %) qui proviendrait de la réduction du TMAO, soit dans l'intestin, soit au niveau du foie (NORRIS-BENOIT 1945).

Des expériences réalisées in-vitro par ARTOM (1950, 1955) avec des micro-tranches de foie de rat, mises à incuber avec de la choline marquée au ^{14}C sur le $-\text{CH}_3$, ont montré la formation de TMAO radioactif.

5) Chez les ruminants la transformation de choline et de bétaine en TMAO, retrouvé dans le lait et dans les urines, a été mise en évidence par DAVIES (1936 et 1937).

Il est également intéressant de noter que, dans leur ensemble, les mammifères ont une teneur en TMAO musculaire supérieure à celle du sang et à celle de l'urine; on retrouve en moyenne 8 mg de TMAO pour 100 g de tissu musculaire frais (KAPELLER-ADLER 1930).

6) Des expériences réalisées in-vitro avec des homogénats de foie de porc ont montré la transformation possible de TMA en TMAO, à condition d'ajouter dans le milieu du triphospho-pyridine-nucléotide réduit (TPNH) et de l'oxygène moléculaire (BAKER 1960 et 1962).

7) Chez le lapin l'administration orale de TMA marqué au ^{15}N (BEMM 1962), ou de carnitine normale ou marquée au ^{15}N (STRACK 1963, DARGEL 1966), provoque une hausse de l'élimination urinaire du TMAO.

Des expériences réalisées in-vitro avec des homogénats d'organes de lapin, ont montré que le foie, les poumons et les reins (dans l'ordre décroissant) étaient capables de transformer TMA en TMAO (BAKER 1963).

8) Chez le cobaye, soumis à un régime normal, on trouve une élimination urinaire de 4,66 mg de TMAO / 100 ml d'urine (CHIANCONE 1940). Mais après administration de TMA, HCl par voie orale ou parentérale, on en retrouve respectivement 41 % et 32 % sous forme de TMAO dans l'urine (MULLER 1942).

B - Chez les vertébrés et invertébrés aquatiques

Les poissons d'eau douce contiennent généralement peu de TMAO dans leur musculature (HOPPE-SEYLER 1933) par rapport aux poissons d'eau de mer qui, selon les auteurs, en renferment entre 50 et 60 mg pour 100 g (COOK 1931, ANDERSON 1952, HEGEMAN 1964).

Chez le requin - qui fut à l'origine de la découverte du TMAO dans les milieux biologiques, par SUWA (1909) -, les taux de TMAO retrouvés dans le muscle sont encore plus élevés, et peuvent atteindre 1430 mg pour 100 g (BEATTY 1939, SUYAMA 1960).

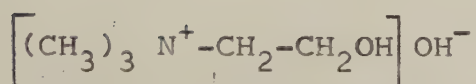
Le TMAO n'est d'ailleurs pas le produit terminal d'une longue chaîne de transformations, car, à son tour, il peut être réduit par des bactéries ou par l'enzyme triamine-oxydase (ELIOTT 1952), pour redonner TMA, ce que l'on observe lorsque le poisson est mal conservé, lui conférant un goût et une odeur très désagréables (BEATTY 1937 et 1938, DYER 1945, HUGHES 1959).

L'origine du TMAO chez les animaux aquatiques est très discutée (GUGGENHEIM 1951). Pour certains comme HEGEMAN (1964) travaillant sur la perche et le brochet, ou GROLLMAN (1929) et GOLDSTEIN (1967) sur des poissons élasmobranches, le TMAO serait d'origine endogène musculaire.

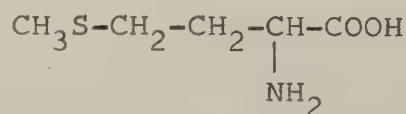
Pour d'autres auteurs (NORRIS 1945, ANDERSON 1952), s'appuyant sur des expériences réalisées respectivement chez la truite et le saumon, le TMAO serait d'origine exogène alimentaire. Les diverses substances impliquées alors seraient principalement la triméthylamine (BAKER 1960 et 1962, BILINSKI 1964, MURRAY 1966) et la choline (KAPELLER-ADLER 1930, LINTZEL 1934, DAVIES

1936, BILINSKI 1960, 1961 et 1962). Accessoirement on a pu montrer l'intervention de la méthionine -qui serait cependant 50 fois inférieure à celle de la choline-, grâce à des études réalisées avec des composés marqués au ^{14}C sur un groupement $-\text{CH}_3$ (BILINSKI 1960, 1961 et 1964). Quant à la bétaïne, produit d'oxydation de la choline, sa transformation en TMAO est peu probable (BILINSKI 1961) contrairement à ce que l'on pensait autrefois (GROLLMAN 1929). On avait envisagé le rôle possible de la carnitine ou de la gamma-butyrobétaïne (BILINSKI 1964), mais il est pratiquement nul.

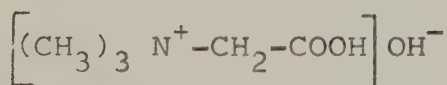
En ce qui concerne les diverses interconversions de ces produits et leur participation au métabolisme de la choline on peut consulter HARPER (1961).



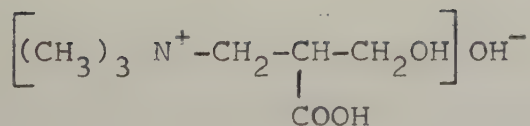
choline



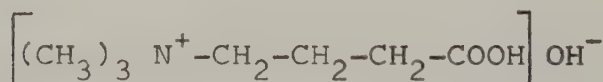
méthionine



bétaïne



carnitine



γ -butyro-bétaïne

III - ROLE BIOLOGIQUE DU T.M.A.O.

Mis à part son rôle supposé dans les phénomènes d'osmorégulation, qui ne concerne que les poissons d'eau de mer (HOPPE-SEYLER 1930, KUTSCHER 1933, SHEWAN 1951, HEGEMAN 1964, LANGE 1965) et qui est par ailleurs contesté (BEATTY 1939), le TMAO posséderait un effet tampon dans l'organisme. Etant une base faible, il a la capacité de tamponner les urines chez l'homme; il donne avec l'acide chlorhydrique des sels, formant tampon vers pH 4,5 (SHEWAN 1951, ARDAILLOU 1965). Il aurait une action identique sur l'acidité gastrique (CHEYMOL 1967).

C'est également un donneur d'oxygène, car on obtient avec son produit de réduction une réaction réversible, qui s'observe in-vivo chez le chien et le chat (MALORNY 1963), ou in-vitro dans les conserves de poisson (HUGHES 1959). On observe le même phénomène, lors de la putréfaction, avec certaines bactéries (ACKERMANN 1926, WATSON 1939).

Le TMAO jouerait vis-à-vis de TMA un peu le même rôle que l'urée vis-à-vis du métabolisme des protéines : ce serait un produit d'élimination peu toxique (HOPPE-SEYLER 1930, BALDWIN 1947). En effet, si l'on compare les toxicités par voie I.V. chez la souris, le TMA a une DL 50 de 90 mg/kg, tandis que le TMAO, $2H_2O$ a une DL 50 de 2850 mg/kg, ce qui permet de considérer l'aminoxyde comme étant environ trente fois moins toxique que l'amine (CHEYMOL 1967, DECHEZ LE PRETRE 1967).

Certains auteurs attribuent au TMAO un rôle de donneur de groupements méthyle selon des expériences réalisées in-vitro avec des homogénats de foie et suivant la réaction :



mais ce serait un mécanisme très particulier, ne s'appliquant qu'aux aminoxydes possédant des groupements méthyle (BACH 1945, BARRENSCHEEN 1949, FISH 1956, b, FERRIS 1967). D'ailleurs certains auteurs contestent ce mécanisme (ERICSON 1960).

IV - PREPARATION DU T.M.A.O.

DUNSTAN et GOULDING (1894 et 1899) ont proposé deux types de synthèse. L'une à partir d'hydroxylamine et d'iodure de méthyle, l'autre à partir de triméthylamine (base ou chlorhydrate) et d'eau oxygénée, en solution aqueuse diluée.



Plusieurs autres méthodes ont été proposées, sur ce dernier principe (MEISENHEIMER 1913, ZIPPEL 1939, MULLER 1940, TOMITA 1944, VAISEY 1956, HICKINBOTTOM 1957, GIGUERE 1961, HAZARD 1962). Selon la concentration de l'eau oxygénée, la réaction est plus ou moins rapide (on laisse de 30 minutes à 24 heures, à température ordinaire) et en évaporant sous vide, on obtient le triméthyl-aminoxide pratiquement cristallisé, car TMA et l'eau oxygénée, volatils, sont éliminés.

Afin de détruire l'excès d'eau oxygénée, qui donne des perhydrates (OSWALD 1963), on traite l'aminoxide par du platine divisé (VAISEY 1956). Par cristallisation dans l'alcool, ou dans l'alcool-acétone, on obtient un produit hydraté $(\text{CH}_3)_3\text{NO}, 2 \text{ H}_2\text{O}$ avec deux molécules d'eau qui ne peuvent être enlevées que sous vide et à chaud. On peut également traiter le produit d'oxydation, concentré, par de l'acide chlorhydrique au 1/10, ce qui donne le chlorhydrate (TMAO, HCl), que l'on fait recristalliser dans l'éthanol puis dans le méthanol et que l'on sèche (DUNSTAN 1899).

Enfin BAKER (1962) a obtenu cet aminoxide par une méthode biosynthétique en utilisant l'action des microsomes de foie de porc, sur du chlorhydrate de TMA, en présence de TPN et d'oxygène à pH 8; l'optimum de la réaction se situe au bout de 20 minutes.

V - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

A - Etat physique de T.M.A., T.M.A.O. et dérivés

Nous avons rassemblé sous forme d'un tableau les caractéristiques physiques de TMA et de son chlorhydrate, de TMAO, son hydrate et son chlorhydrate; les éléments de ce tableau ont été empruntés à plusieurs auteurs (DUNSTAN 1899, SUWA 1909, HENZE 1914, POLLER 1926, HOPPE-SEYLER 1928, MULLER 1940, TOMITA 1944, RONOLD 1947, GALLAIS 1956, GIGUERE 1961, BAKER 1962, CHEYMOL 1967).

Caractéristiques physiques de T.M.A., T.M.A.O. et dérivés .

	Points de fusion	Point d'ébullition	Solubilités	Etat physique
T.M.A.	- 124° C	+ 3,5° C	très sol. eau, éthanol sol. éther	gaz
T.M.A., HCl	270° - 272° C (277°-278° C avec décomposition)		sol. éthanol peu sol. chloroforme ins. éther	aiguilles
T.M.A.O.	212° C sous vide (ou 208° C)		très sol. eau, méthanol sol. éthanol ins. éther	aiguilles très hygroscopiques
T.M.A.O., 2H ₂ O	96° - 98° C		sol. eau, méthanol, chloroforme chaud peu sol. éthanol ins. éther, tétrachlorure de carbone, benzène, éther de pétrole	aiguilles hygroscopiques
T.M.A.O., HCl	217°-218° C avec décomposition partielle		sol. eau, méthanol chaud	aiguilles incolores, prismatiques, peu hygroscopiques

Afin de vérifier la spécificité du point de fusion, on a proposé de transformer le chlorhydrate de TMAO en picrate, reineckate, chloraurate, et chloroplatinate.

Le picrate de TMAO se présente sous forme d'aiguilles jaune-pâle, peu solubles dans l'eau froide ou l'éthanol. Le point de fusion : $F = 197^{\circ}-201^{\circ} \text{ C}$ est donné par différents auteurs (HANTZSCH 1898, SUWA 1909, HENZE 1914, POLLER 1926, HOPPE-SEYLER 1928 et 1933, NORRIS et BENOIT 1945).

Le chloraurate de TMAO répond à la formule : $(\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}, \text{HCl}) \text{AuCl}_3$. Le point de fusion : $F = 255^{\circ}-257^{\circ} \text{ C}$ peut se prendre soit directement selon la méthode habituelle, soit en tube scellé, ce qui est plus précis (SUWA 1909, HENZE 1914, POLLER 1926, HOPPE-SEYLER 1928, GROLLMAN 1929, LINTZEL 1939, NORRIS et BENOIT 1945).

Le chloroplatinate de TMAO répond à la formule : $(\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}, \text{HCl})_2, \text{PtCl}_4$. Il apparait sous forme de cristaux brillants, jaune-foncé : $F = 214^{\circ}-216^{\circ} \text{ C}$ selon les premiers auteurs (HANTZSCH 1898, SUWA 1909), puis : $F = 244^{\circ}-247^{\circ} \text{ C}$ selon les suivants (HENZE 1914, POLLER 1926, TOMITA 1944).

Le reineckate de TMAO, dont la formule est : $(\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}) (\text{SCN})_4 (\text{NH}_3)_2 \text{CrH}$, cristallise sous forme d'aiguilles rouges, disposées en rosettes, changeant de couleur dès 220° C , et se décomposant vers 247° C (MULLER 1940, BREGOFF 1953).

Il existe d'autres composés d'addition : ainsi avec le chlorure mercurique $(\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}, \text{HCl}, \text{HgCl}_2, 2\text{H}_2\text{O})$, et le chlorure de cadmium $(\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}, \text{HCl}, \text{CdCl}_2)$, selon SUWA (1909).

L'acide oxalique donne avec TMAO un sel cristallisé, non hygroscopique : $F = 119^{\circ} \text{ C}$ (SINSHEIMER 1967).

B - Réactions colorées

Le TMAO réagit avec les vapeurs d'iode en donnant une coloration brune, et avec le réactif acétique à l'iodure de bismuth, en donnant une coloration jaune-orangé (MERLEVEDE 1959).

Le réactif de DRAGENDORFF nitro-chlorhydrique, modifié (BREGOFF 1953, BILINSKI 1964) pulvérisé sur un chromatogramme, fait apparaître les spots de TMAO en orangé sur fond jaune.

Le Vert de bromocrésol en solution éthanolique à 0,2 % fournit, sur un chromatogramme lavé à l'eau acidulée, des spots de TMAO bleus sur un fond jaune (BAKER 1962).

Le réactif à la ninhydrine (MIYARA 1960, KOISUMI 1965), pulvérisé sur des chromatogrammes, que l'on chauffe ensuite à 105° C, fait apparaître le TMAO en jaune.

Le réactif de LEVINE (1951) s'applique à la révélation des chromatogrammes : après migration, le papier est placé dans un bain d'acide phosphomolybdique en solution aqueuse à 2 %, puis on le lave dans du butanol, et encore 5 minutes dans l'eau courante. On l'immerge ensuite dans une solution de chlorure stanneux à 0,4 % dans l'acide chlorhydrique (3 N), et enfin on le sèche à la température ordinaire. On obtient alors des spots bleu-foncé sur fond bleu-pâle, pour le TMAO.

C - Spectre ultra-violet

Le TMAO a un maximum d'absorption à 198 nm, avec un coefficient d'extinction $E = 2.350$, lorsqu'il est en solution dans l'acétonitrile. Ce pic serait dû à une transition $n \rightarrow \pi^*$ d'un doublet libre de l'oxygène vers l'orbitale moléculaire antiliante π^* de l'azote. En solution dans des solvants plus polaires comme l'eau ou l'éthanol, le coefficient d'extinction diminue (YAMAKAWA 1966).

D - Spectre infra-rouge

Le TMAO présente une bande d'absorption entre 950 et 970 cm^{-1} , caractéristique de la liaison N ---O des N-Oxydes aliphatiques (KIDA 1963).

Ce spectre peut être obtenu, soit après inclusion dans une pastille de KBr (MATHIS-NOEL 1956, GIGUERE 1961, BAKER 1962, OSWALD 1963), soit après mise en suspension dans le Nujol, le Fluorolube ou l'hexachlorobutadiène (COOK 1963).

Le spectre de vibration dans l'I.R. serait dû à la structure spatiale de la molécule de TMAO, où l'azote est tétravalent selon KURODA (1966).

L'absorption spectrale décroît suivant que l'on considère le spectre du TMAO anhydre, de son hydrate ou de son chlorhydrate (MATHIS-NOEL 1956). Pour le chlorhydrate, on remarque deux fortes bandes à 1530 et 2600 cm^{-1} dues à l'ion hydroxy-triméthyl-ammonium (GIGUERE 1961).

TSOUCARIS (1961) a réalisé l'étude de la liaison semi-polaire N-O de divers aminoxydes comparés au TMAO, en s'appuyant sur la spectrographie I.R. et sur leur moment dipolaire.

E - La structure cristalline du TMAO (cristaux monocliniques) a été étudiée par RERAT (1960) et CARON (1964).

F - Le pouvoir rotatoire magnétique de la liaison semi-polaire N-O du TMAO et d'autres aminoxydes a fait l'objet des travaux de GALLAIS (1956).

VI - EXTRACTION DU T.M.A.O. A PARTIR DES MILIEUX BIOLOGIQUES

A - A partir des différents organes

Après homogénéisation et broyage, les matières protéiques mises en suspension dans l'eau ou dans l'éthanol, sont extraites et éliminées par un traitement à l'acide trichloracétique à 10 % (DYER 1945 et 1952, BREGOFF 1953, VERLANKAR 1958 et 1960, BILINSKI 1960-1962), ou par le tungstate de sodium en milieu sulfurique (ZIPPEL 1939), ou encore par l'acide phosphotungstique (ACKERMAN 1957).

Par filtration ou centrifugation, on obtient une solution enrichie en TMAO, que l'on peut purifier par l'éther ou l'alcool (HOPPE-SEYLER 1928, KAPPELLER-ADLER 1930, BILINSKI 1960) ou encore par le phénol dilué (BILINSKI 1960).

B - A partir de l'urine ou du plasma

Le traitement par le tungstate de sodium en milieu chlorhydrique s'applique également ici, pour éliminer les protéines (COHEN 1958). Il en est de même pour l'acide phosphotungstique (POLLER 1926). On peut aussi, après concentration des urines en milieu acide ou basique, pratiquer une extraction par l'éthanol (TAKEDA 1909, GROLLMAN 1929) ou par le phénol (MERLEVEDE 1959).

Les extraits obtenus précédemment peuvent être purifiés sur des colonnes échangeuses d'ions, après concentration. L'emploi de résine Dowex 50, X4 ou X12, de 100 à 400 mesh, ou d'Amberlite CG-50, CG-120 ou IRA 401, est alors intéressant. L'élution se fait par l'acide chlorhydrique dilué, l'acide acétique ou encore par un tampon citraté (FRIEDMAN 1955, BILINSKI 1960, NIYAHARA 1960, PRENTISS 1961, SINSHEIMER 1967).

VII - SEPARATION ET IDENTIFICATION DU T.M.A.O.

Autant au cours de la synthèse du TMAO, que de sa mise en évidence dans les organismes animaux, il est indispensable de procéder, après l'extraction, à la séparation et à l'identification. Pour cela, les techniques chromatographiques et électrophorétiques, apportent des méthodes sensibles et précises.

1. Chromatographie sur papier

Plusieurs formules de solvants ont été proposées :

BREGOFF (1953) utilise soit un solvant monophasique : alcool à 95°-ammoniaque concentrée (95:5) qui donne un Rf de 0,51 pour le TMAO en cuve très étanche; soit un solvant diphasique, dont la phase supérieure sert à la migration et la phase inférieure à la saturation de l'atmosphère. Il s'agit du mélange butanol-acide acétique-eau (10:3:8).

FRIEDMAN (1955) travaille avec le solvant : méthyléthylcétone-alcool isopropylique-acide chlorhydrique concentré (3:5:2) et trouve un spot de Rf. 0,52 pour le TMAO.

BAKER (1962 et 1963) propose les mélanges suivants :

= n-butanol saturé d'acide acétique à 25 %

= n-butanol acide formique-eau (70:10:13).

Pour le TMAO, $2H_2O$, les Rf sont respectivement de 0,67 et de 0,41.

2. Chromatographie en couche mince

SINSHEIMER (1967) emploie l'Alumine G avec le solvant : méthanol-tétrachlorure de carbone-acide acétique (10:30:1).

3. Chromatographie en phase gazeuse

La réduction préliminaire du TMAO en TMA, permet d'utiliser la chromatographie en phase gazeuse. On emploie soit une colonne de Célite imprégnée du mélange hendécanol/n-octadécane (4:1) avec l'azote comme gaz vecteur, à 65° C (HUGHES 1959), soit une colonne garnie de poudre de Téflon et imprégnée de Polyglycol 1500 ou d'Apiézon L, à 130° C (LANDAULT 1964).

4. Electrophorèse sur papier

MERLEVEDE (1959) propose une technique d'électrophorèse, sur papier Whatman n° 1, en milieu tamponné acide acétique-acétate de sodium (pH 3,1). En 1 h 30, d'après les distances de migration, on peut séparer TMA du TMAO. Si le spot est déposé à mi-chemin entre l'anode et la cathode, TMAO migre de 63 mm et TMA de 88 mm. Si le spot est à 5 cm. de l'anode, TMAO migre alors à 70 mm et TMA à 92 mm. Dans les deux cas, on observe que la moindre basicité du TMAO, par rapport à TMA, entraîne une migration plus lente en direction de la cathode.

VIII - DOSAGE DU T.M.A.O.

La plupart des méthodes citées, reposent sur la réduction chimique ou accessoirement enzymatique, du TMAO en TMA, que l'on recueille par distillation ou par microdiffusion, dans un excès d'acide. Le dosage peut alors se terminer par une mesure acidimétrique ou colorimétrique.

A - Par réduction en triméthylamine

a) Réduction au moyen de l'hydrogène naissant

La solution de TMAO à titrer est acidifiée fortement par de l'acide chlorhydrique. On ajoute une certaine quantité de zinc (LINTZEL 1934) ou d'alliage Dewarda (LINTZEL 1934, ZIPPEL 1939, TARR 1940, DYER 1952). Suivant la température, la durée de réaction est variable. Cependant, la réduction par l'alliage Dewarda ne serait pas quantitative : d'après BYSTEDT (1959), le rendement n'atteindrait que 50 à 80 % selon les cas.

On obtient un chlorhydrate de triméthylamine, qui, en milieu alcalin, peut redonner la triméthylamine base. Celle-ci est recueillie par barbotage sous vide (BENOIT 1942) ou par entraînement dans un courant d'air (LINTZEL 1934), dans une solution d'acide chlorhydrique de titre connu.

Afin de ne pas déplacer l'ammoniac qui pourrait exister dans les matières biologiques, on le fixe au préalable par du formol.

En titrant l'excès d'acide, on en déduit la quantité de TMA et par conséquent de TMAO dans la solution initiale, à condition d'avoir fait un témoin pour tenir compte de TMA préexistant (BEATTY 1936 et 1939, NORRIS-BENOIT 1945, DYER 1952, PRENTISS 1961).

La technique de micro-diffusion, dans une cellule de Conway, est également applicable pour ce dosage (CONWAY 1933 et 1947, TARR 1940 et 1941, BEATTY-GIBBONS 1936, WRANNE 1956).

On peut aussi terminer le dosage par colorimétrie :

- à 420 nm, du picrate de TMA en milieu anhydre (DYER 1945, SAITO 1956, HASHIMOTO 1957 et 1958).
- à 620 nm, du produit de réaction de TMA avec le réactif de FOLIN-CIOCALTEU au phénol (DE LA HUERGA 1956, PRENTISS 1961).

b) Réduction par le trichlorure de Titane ($TiCl_3$)

En milieu acide ou en milieu alcoolique, le trichlorure de titane à 10 ou 15 %, réduit en moins d'une heure et à la température ordinaire, le TMAO en TMA, que l'on obtient à l'état de chlorhydrate. Comme dans les techniques précédentes, il suffit de le déplacer par une base, soit dans un appareil du type Parnas et Wagner (JAKOBSEN 1944, RONOLD 1947) soit dans un appareil type Conway, et de le recueillir dans un excès connu d'acide chlorhydrique, dilué, titré (HJORTH-HANSEN 1952, COHEN 1958). On peut également terminer par une colorimétrie du picrate, comme dans le cas précédent (BYSTEDT 1959).

c) Réduction par le chlorure stanneux ($SnCl_2$)

On utilise une solution chlorhydrique titrée de chlorure stanneux (COOK 1931, REAY 1938, GLYNN 1947, KERMAK 1955). Après réduction du TMAO, on titre l'excès de réducteur qui n'a pas réagi, au moyen d'une solution titrée d'alun ferrique. Selon BEATTY (1938) le rendement de cette méthode ne dépasserait pas 65 %.

d) Réduction par l'iodure de potassium en milieu acide

Revenant sur des travaux antérieurs controversés, dûs à POLONOVSKI (1926), HOEFT en 1963 s'est à nouveau intéressé à la réduction des N-Oxydes par l'iodure de potassium en milieu acide.

L'auteur a mis en évidence l'importance du choix de l'acide utilisé. Il a constaté que cette réduction d'un N-Oxyde tel que TMAO, ne pouvait avoir lieu qu'en présence d'un acide organique en milieu tamponné (par exemple acide acétique-acétate de sodium), tandis qu'elle était nulle en présence d'acide minéral du type acide chlorhydrique.

Il explique ceci, par la formation immédiate d'un sel entre TMAO et HCl, bloquant ainsi l'oxygène, et l'empêchant d'agir comme oxydant sur l'iodure de potassium. Ce phénomène ne se produit pas en milieu tamponné. Par contre, s'il restait de l'eau oxygénée fixée sur le TMAO, elle réagirait dans les deux cas.

C'est pourquoi, lorsqu'il travaille en quantitatif, l'auteur a recours à deux titrages successifs, l'un en milieu HCl, l'autre en milieu tampon, et par différence il en déduit la quantité de N-Oxyde initialement présente. Pour TMAO, le rendement trouvé est de 98,1 % (HOEFT 1963), la réaction est rapide et presque totale au bout de 30 minutes.

e) Dosage du reineckate

Dans un premier temps, on cherche à obtenir un reineckate de TMAO. Celui-ci est alors lavé et séché. Puis, sous l'action de l'eau oxygénée, en milieu alcalin, on oxyde le chrome du reineckate, qui, à son tour, pourra agir sur une solution d'iodure de potassium en milieu acide. L'iode libéré, sera titré par du thiosulfate de sodium (MULLER 1940).

f) Réduction par les thiols

A un pH et à une température déterminés, la réduction du TMAO peut avoir lieu avec la cystéine, en présence de fer ou d'hémoglobine comme catalyseur (COOK 1931, VAISEY 1956), avec le glutathion (ACKERMAN 1926), ou l'acide thioglycolique (SOKOLOV 1966) : TMA obtenue est alors titrée comme précédemment.

g) Réduction enzymatique

En 1944, TOMITA avait déjà réalisé la transformation du TMAO en TMA, en présence de levure.

Par la suite, des suspensions de bactéries ont pu jouer le même rôle (WOOD 1943, BAIRD 1944, CASTEIL 1949 a et b, 1950, 1951).

Enfin, une triamine-oxydase (TARR 1939, 1940 et 1941, TSUCHIYA 1951 et 1952, ELIOTT 1952), et une TMAO-réductase ont également donné de bons résultats (KAWABATA 1953, UNEMOTO 1965).

B - Méthode radioactive

Avec de la triméthylamine marquée au ^{15}N (BEMM 1962, STRACK 1963) ou au ^{14}C (BILINSKI 1960, BAYER-CHAYKIN 1960), administrée à l'animal, on peut suivre quantitativement l'élimination du TMAO, que l'on distingue de TMA, soit par réduction, soit par différence de migration en chromatographie sur papier et dont on mesure la radioactivité **sur les spots**.

C - Dosage potentiométrique

Selon CASTELL (1950), le potentiel Red-Ox du système $\text{TMAO} \rightleftharpoons \text{TMA}$, se situerait entre 0,12 et 0,14 volt à pH 7,2. La réduction du TMAO en TMA serait maximum à pH 7,8 en présence de cystéine et de fer trivalent (VAISEY 1956).

IX - CONCLUSION

La révélation, assez surprenante, de la présence de TMAO dans divers organismes animaux, bien qu'ayant suscité de très nombreux travaux, n'a pas encore permis de dégager une conception bien précise des mécanismes d'oxydation biologiques de TMA, pas plus que de son rôle exact.

Cependant, ces recherches ont conduit à l'établissement de nombreuses méthodes d'extraction, de séparation, d'identification et de dosage. Néanmoins, ces dernières n'ont pas un caractère définitif et leur contrôle s'imposera à l'expérimentateur.

Deuxième Partie

TRAVAUX PERSONNELS

SUR LE TRIMETHYLAMINOXYDE

Afin de nous familiariser avec les diverses techniques de préparation et d'identification des N-Oxydes, nous avons pensé étudier de près le comportement de la triméthylamine (TMA) et de son N-Oxyde (TMAO), dont la constitution ne donne lieu à aucune discussion.

I - PREPARATION DE T.M.A.O.

Nous avons préparé TMAO à partir de la base correspondante, TMA, par l'une des méthodes suivantes. Selon les cas, nous avons employé soit une solution de TMA préparée par nos soins à partir de son chlorhydrate, soit la solution aqueuse du commerce à 30 %.

Nous inspirant des travaux de MULLER (1940), nous avons tenté une première synthèse, en ajoutant à la solution aqueuse commerciale de TMA à 30 % (10 ml), de l'eau oxygénée diluée à 3 % ou 10 volumes (60 ml). L'opération a été conduite dans un ballon à fond rond et encolure rodée normalisée, permettant son adaptation ultérieure à un appareil évaporateur rotatif.

Après un temps de contact de 24 heures, le mélange a été concentré sous pression réduite (15 mm Hg) à une température voisine de 60° C, dans un appareil évaporateur rotatif (fabrication PROLABO), jusqu'à obtention d'un faible volume.

La liqueur obtenue, fut analysée par chromatographie sur papier ou sur couches minces, que nous décrirons ultérieurement : ceci permet de vérifier son homogénéité (c'est-à-dire en particulier l'absence de TMA en excès).

Par ailleurs, une autre portion de la liqueur, évaporée à sec, et recristallisée plusieurs fois dans du méthanol, abandonna un résidu blanc, dont le point de fusion instantané, situé entre 96°C et 98°C , permet de confirmer qu'il s'agit de $\text{TMAO}, 2\text{H}_2\text{O}$, en se référant aux données de la littérature.

Une autre méthode, employée plus récemment par BURCKARD (1963), et qui s'inspire des travaux de l'école russe de LEBEDEV (1960), nous a paru séduisante, car elle améliore le rendement de la méthode précédente, grâce à l'addition d'un catalyseur, le tungstate de sodium, et d'un stabilisant de l'eau oxygénée, l'E.D.T.A. (sel sodique de l'acide éthylène-diamino-tétracétique).

Nous avons donc mélangé :

TMA à 20 %	15 ml
Na_2WO_4 à 2,5 %	2,5 ml
H_2O distillée	6 ml
E.D.T.A.	0,20 g.

puis nous avons ajouté très lentement, en 45 minutes environ, de l'eau oxygénée à 15 % ou 50 volumes (14 ml), à la température ordinaire. Après un repos de 24 heures, nous avons évaporé sous vide comme précédemment, à 60°C , jusqu'à obtention d'un résidu sec, qui repris par l'éthanol, laissa un précipité de Na_2WO_4 que l'on élimina par filtration sur entonnoir de BÜCHNER.

La liqueur restante, concentrée à l'évaporateur rotatif une nouvelle fois, donna un résidu, que l'on acheva de déshydrater dans un exsiccateur à vide sulfurique. Après plusieurs recristallisations dans le méthanol et séchage, les cristaux blancs obtenus avaient un point de fusion instantané : $F = 96^{\circ}\text{C}$, correspondant à celui du $\text{TMAO}, 2\text{H}_2\text{O}$.

Une preuve supplémentaire de l'identité de ce composé synthétisé, est sa transformation en picrate, dont le point de fusion instantané est trouvé à 200° C, en accord avec SUWA (1909).

Nous avons pu également transformer le dihydrate de TMAO en chlorhydrate, en nous référant aux travaux originaux de DUNSTAN et GOULDING (1898). Ainsi à 0,5 gramme de TMAO, 2 H₂O préparé par nos soins, nous avons ajouté 5 ml d'acide chlorhydrique au 1/10, et placé le tout dans l'appareil à évaporation rotative, non relié au vide, pendant 15 minutes, afin de réaliser une bonne agitation, sans diminution de volume. Puis, après concentration sous pression réduite, nous avons obtenu des cristaux blancs, qui, lavés par l'éthanol, et recristallisés plusieurs fois dans le méthanol chaud, furent enfin séchés à l'exsiccateur. Leur point de fusion instantané : F = 220° C, au lieu de 217° C selon GIGUERE (1961).

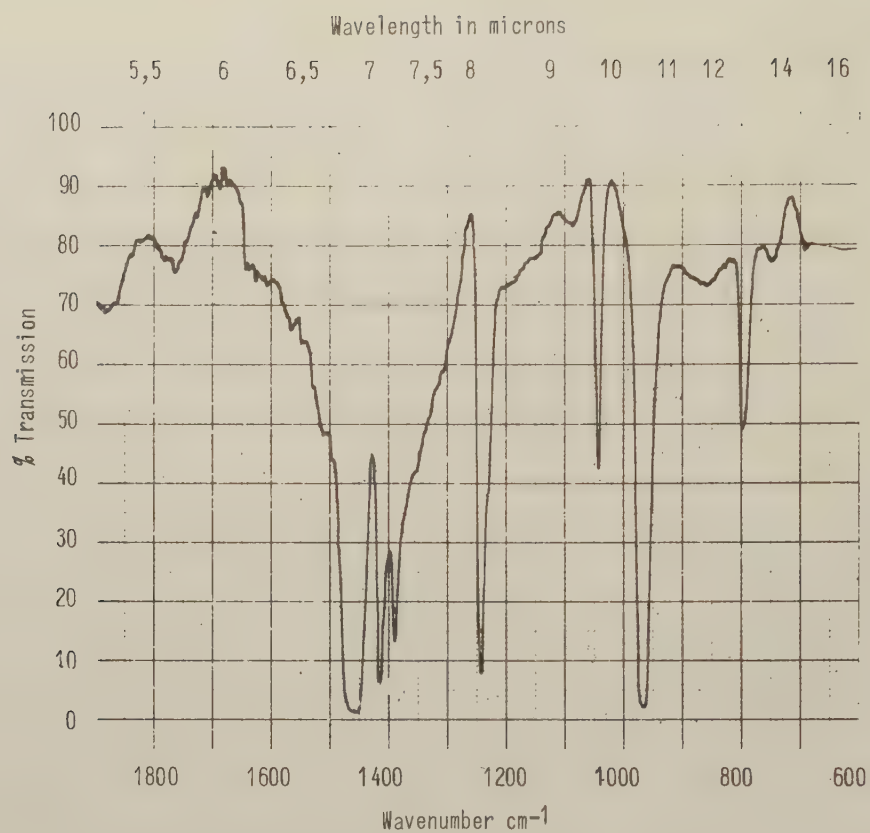
§

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

- a) Solubilités de TMAO, 2 H₂O : Très soluble: H₂O et méthanol
Assez soluble: éthanol
Insoluble: éther, benzène,
tétrachlorure de carbone
et éther de pétrole.

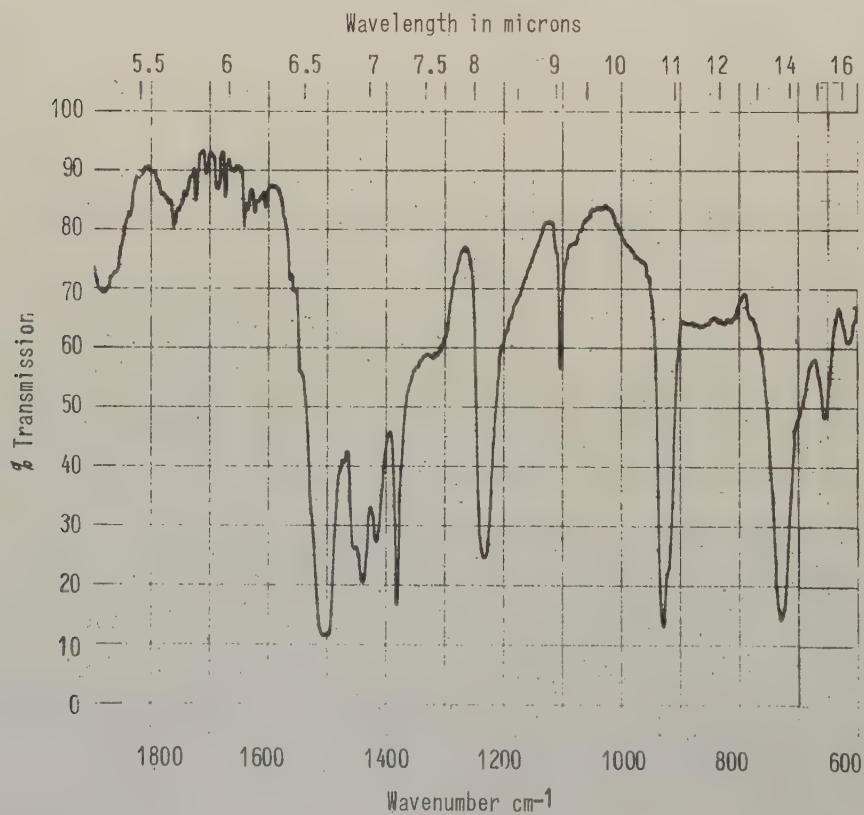
Ces caractères de solubilité sont confirmés par la littérature antérieure.

b) Spectre Ultra-Violet : Les travaux de YAMAKAWA (1966), nous ayant appris que le maximum d'absorption de TMAO dans divers solvants tels que l'acétonitrile ou de dichlorométhane, se situait à 220 nm, nous n'avons pas pu entreprendre d'autres essais, car cela sortait de la gamme de sensibilité de l'appareil que nous avons à notre disposition.



TRIMETHYLAMINE (CHLORHYDRATE)

SPECTRE I.R. N° 1



TRIMETHYLAMINOXYDE
(CHLORHYDRATE)

SPECTRE I.R. N° 2

c) Spectre Infra-Rouge : Nous disposions d'un spectrographe infra-rouge BECKMANN, modèle IR 10, équipé de deux réseaux placés dos à dos :

- = le premier réseau, de 100 traits/mm, permet de travailler, dans le premier ordre entre 2000 et 600 cm^{-1} , et dans le second ordre entre 4000 et 2000 cm^{-1} .
- le deuxième réseau, de 40 traits/mm, permet de travailler uniquement dans le premier ordre, entre $650\text{ et }300\text{ cm}^{-1}$.

L'absence de prisme -remplacé par des réseaux-, permet une haute résolution et une bonne précision sur les fréquences, de l'ordre de 4 cm^{-1} , si l'on travaille entre 2000 et 300 cm^{-1} .

Par ailleurs, la lumière parasite étant plus faible dans la gamme des fréquences supérieures à 600 cm^{-1} , nous avons choisi dorénavant de nous intéresser à l'enregistrement spectral situé entre 2000 et 600 cm^{-1} , pour tous les composés dont nous avons réalisé les spectres infra-rouge.

D'un point de vue pratique, en ce qui concerne TMA et TMAO, nous avons opté pour la technique du pastillage avec un halogénure alcalin. Celui-ci a l'avantage de convenir à la fois pour l'amine et pour l'aminoxyde, et de plus ne présente pas de pics d'absorption dans la gamme spectrale qui nous intéresse, contrairement aux solvants habituellement utilisés en I.R., tels que le chloroforme, le dioxanne, ou le tétrachlorure de carbone.

Nous avons pu constater en effet, que si l'on soumet au pastillage un échantillon de l'ordre de 250 mg de KBr très pur et sec (afin d'éviter les bandes d'absorption de l'eau), en le comprimant dans une presse hydraulique, sous 8T/cm^2 , on obtient une pastille cylindrique de 13 mm de diamètre sur environ 1 mm d'épaisseur, parfaitement transparente, et dont l'absorption est pratiquement nulle dans la gamme des fréquences considérées. Il faut signaler qu'après plusieurs essais infructueux, nous avons eu recours à l'utilisation du bromure de potassium MERCK pour spectroscopie, dont la pureté et la finesse convenaient particulièrement bien.

Les pastilles que nous avons réalisées renfermaient respectivement 3,3 mg de TMA, HCl pour 262 mg de KBr (Spectre I.R. N° 1), et 1,5 mg de TMAO, HCl pour 250 mg de KBr (Spectre I.R. N° 2). L'homogénéisation de chaque

mélange est réalisée dans un petit mortier d'agate, pendant un temps constant et assez bref, de l'ordre d'une minute, afin d'éviter au maximum les phénomènes d'hydratation, qui perturbent considérablement le spectre I.R.

L'étude de nos enregistrements spectraux, appuyée sur la consultation de divers ouvrages spécialisés (dûs à BELLAMY 1958, CROSS 1957, FREEMAN 1965, MILLER 1965) nous a révélé la position de quelques bandes d'absorption caractéristiques :

- = tout d'abord à $1460-1470\text{ cm}^{-1}$, on trouve un pic correspondant à la vibration de déformation de la liaison $\text{CH}_3 - \text{N}$, qui est donc commun à TMA et à TMAO.
- = puis à 800 et 1040 cm^{-1} , deux pics qui correspondent à la vibration de valence C-N , pour TMA, et un pic à 740 cm^{-1} qui est l'équivalent pour TMAO.
- = enfin, la vibration de valence due à la liaison $\text{N} - \text{O}$, et qui est propre à l'aminooxyde aliphatique, se situe à 935 cm^{-1} pour TMAO.

d) Réactions chimiques :

= action de l'oxygène de l'air : on laisse à l'air libre une solution aqueuse de TMA, soit à température ordinaire, soit au réfrigérateur. Puis on chromatographie après 3 jours, 4 jours et 5 jours respectivement : dans tous les cas on n'observe pas de spot, ce qui prouve que TMA, restée inchangée dans ces conditions, s'est volatilisée, contrairement à ce qui se serait produit si, par auto-oxydation, TMA s'était transformée en TMAO qui aurait été facilement repérable sur le chromatogramme.

Par ailleurs, si l'on évapore à sec quelques millilitres d'une solution aqueuse de TMA du commerce (donc déjà ancienne, quant à sa préparation) on n'obtient pas de résidu : donc le produit en solution était entièrement volatil, constitué uniquement de TMA, sans aucune trace de TMAO, qui aurait laissé un résidu solide blanc.

On en conclut que TMA n'est pas auto-oxydable à l'air. Cette constatation a son importance, car elle garantit l'authenticité des résultats des auteurs antérieurs lorsqu'ils rapportaient avoir trouvé TMAO dans divers produits biologiques.

= action du réactif de DRAGENDORFF modifié par MERLEVEDE (1956) : (solution acétique de sous-nitrate de bismuth à laquelle on ajoute une solution aqueuse d'iodure de potassium). Nous avons réalisé pour ce réactif comme pour les suivant des "spots-tests" sur papier Whatman : TMAO donne un spot jaune-pâle sur fond jaune-foncé, tandis que le chlorhydrate de TMA fournit un spot orangé.

= action du réactif de DRAGENDORFF modifié par BILINSKI (1964) : (solution nitrique de sous-nitrate de bismuth, que l'on verse peu à peu dans une solution chlorhydrique d'iodure de potassium). Avec ce réactif, TMAO donne une coloration orangé-pâle, qui s'accroît avec le temps, tandis que TMA donne un spot orangé net.

Avec ces deux réactifs de DRAGENDORFF modifiés, nous avons constaté la moindre coloration fournie par TMAO comparé à TMA, et qui s'explique par sa basicité diminuée par rapport à l'amine de départ TMA.

= action d'une solution d'iode à saturation dans l'éther de pétrole: (formule Professeur CHAMBON). Qu'il s'agisse de TMA ou de TMAO, on obtient avec ce réactif des spots brun-foncé (dont l'intensité est proportionnelle à la concentration) sur un fond plus clair.

= action d'une solution alcoolique à 0,2% de Vert de Bromocrésol : TMAO fournit un spot bleu sur fond jaune, tandis que dans ces conditions TMA ne laisse apparaître qu'une légère teinte gris-bleuté. Ce réactif est cité par BAKER (1962), qui l'utilise dans les mêmes conditions.

= action du réactif Naphtylamine-Sulfanilique : ce réactif est utilisé par PRUSSMANN (1964, a) pour révéler les nitrosamines. Par extension nous avons pensé adapter ce réactif à la recherche d'un N-Oxyde, qui possède également un groupement N-O dans sa molécule.

Ce réactif est constitué par le mélange extemporané, à parties égales, d'une solution à 1 % d'acide sulfanilique dans de l'acide acétique à 30 %, et d'une solution à 0,1 % de naphtylamine- α dans l'acide acétique à

30 %. On pulvérise ce réactif sur des chromatogrammes pré-irradiés pendant trois minutes sous une lumière U.V. de courte longueur d'onde (254 nm par exemple).

Nous avons obtenu pour TMAO un spot rose foncé sur fond rose clair : ce spot se décolore et vire au jaune après quelques heures de contact à l'air; par contre TMA n'est pas du tout révélé avec ce réactif, ainsi que l'on pouvait s'y attendre.

e) Identification chromatographique

1. sur papier : nous avons utilisé, comme support, du papier Whatman N° 1 -simple ou imprégné d'une solution tampon suivant les cas-.

SOLVANT	PAPIER	MIGRATION	TMA, HCl	TMAO, 2H ₂ O
Butanol saturé d'eau (selon MUNIER 1953)	Phosphaté (pH 4,2)	3 h.30 (158 mm)	Rf: 0,08	Rf: 0,107
Butanol sat. de tampon citro-phosphaté (selon GOLDBAUM 1950)	Citro-phosphaté (pH 5)	6 h.30 (185 mm)	Rf: 0,08	Rf: 0,104
Butanol-acide formique-eau (77:10:13) (selon BAKER 1962)	Simple	4 h.30 (157 mm)	Rf: 0,30	Rf: 0,51
		6 h. (174 mm)	Rf: 0,32	Rf: 0,49
Butanol sat. d'ammoniaque (N)	simple	3 h. (119 mm)	-	Rf: 0,21
Butanol sat. eau-acide acétique (60:1)	simple	6 h. (164 mm)	Rf: 0,13	Rf: 0,24
Mélange diphasique : Chloroforme-benzène-eau (10:10:6)	Imprégné avec anhydride acétique- benzène (1:3) et séché	3 h.15 (170 mm)		
A. Phase inférieure			Rf: 0,17	Rf: 0,46
B. Phase supérieure			Rf: 0,83	Rf: 0,80

2. chromatographie sur couches minces : nous avons utilisé des plaques de verre enduites par nos soins, soit de Kieselgel G MERK, soit d'Alumine

SOLVANT	NATURE DE LA COUCHE	MIGRATION	TMA, HCl	TMAO, 2H ₂ O
Méthanol-Tétrachlorure de carbone - Acide acétique (10:30:1) selon SINSHEIMER (1967)	Kieselgel G	1 h.	Rf: < 0,10	Rf: < 0,10
	Alumine	1 h.	Rf: env. 1,00	Rf: env. 0,90
Phénol-eau (8:3) selon TEICHERT (1960)	Kieselgel G	2 h. (122 mm)	Rf: 0,54	Rf: 0,58

III - CONCLUSION

Ces travaux sur le TMAO nous ont permis, dans un premier temps, de regrouper des résultats antérieurs fort dispersés depuis la fin du siècle dernier, et dans un second temps, d'apporter quelques discriminations pratiques, notamment dans le choix des réactions d'identité susceptibles d'applications dans nos travaux sur d'autres aminoxydes.

Ainsi les meilleures séparations chromatographiques du chlorhydrate de TMA et du TMAO, ont été obtenues sur papier par le mélange : chloroforme-benzène-eau (10:10:6), alors que sur couches minces de silice ou d'alumine la séparation n'a pu être réalisée.

Parmi les réactifs révélateurs non spécifiques, la solution éthéropétrolique d'iode est très sensible, mais les réactifs iodo-bismuthiques permettent une petite différenciation entre TMA et TMAO, du fait de leur inégale basicité.

Nous avons pu apporter une réaction nouvelle à la détection des aminoxydes, en élargissant l'application du réactif naph^{ty}lamine-sulfanilique

de PRUSSMANN (1964) orienté vers la détection des nitrosamines : le TMAO donne une coloration rose, tandis que TMA ne donne aucune réaction.

Enfin, le spectre I.R. obtenu à partir d'un comprimé de KBr imprégné de TMAO, nous a permis de localiser à 935 cm^{-1} la bande due à la liaison N-O du N-Oxyde aliphatique.

Troisième Chapitre

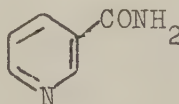
NICOTINAMIDE

Première Partie

TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA
NICOTINAMIDE

I - INTRODUCTION

La nicotinamide, ou vitamine PP, est un médicament inscrit au Codex 1965. C'est l'amide de l'acide pyridine-carboxylique-3, qui répond par conséquent à la formule suivante :



Cette substance est peu toxique, ainsi que le prouve sa DL 50 qui est chez le rat de 1680 mg/kg par voie sous-cutanée (SPECTOR 1956). Chez l'homme, on l'utilise pour ses propriétés vitaminiques, à raison de 0,40 à 0,50 g par jour, par voie buccale (selon la documentation du fabricant, ROCHE), mais elle est pratiquement dénuée de toxicité et on peut l'employer à des doses très supérieures dans les cas de carence, dont la pellagre est l'exemple le plus caractéristique.

Le but de notre travail étant la mise en évidence de métabolites à fonction N-Oxyde, nous nous sommes attaché à la recherche, dans la littérature, de tout ce qui concernait la nicotinamide et son N-Oxyde, que nous étudierons conjointement.

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

1. Préparation du N-Oxyde de nicotinamide

S'inspirant des travaux antérieurs de OCHIAI (1943) sur les N-Oxydes pyridiniques, et de CLEMO (1949) sur le N-Oxyde de l'acide nicotinique, plusieurs auteurs ont successivement abordé la synthèse du N-Oxyde de nicotinamide, par action de l'eau oxygénée, en milieu acétique, à chaud, sur la nicotinamide.

En 1957, TAYLOR dissolvait 100 g de nicotinamide, à chaud, dans un litre d'acide acétique, puis ajoutait 160 ml d'eau oxygénée à 30 % (100 volumes) et chauffait à reflux pendant 3 h.30 au bain-marie. Par distillation sous pression réduite et reprise par le minimum d'eau bouillante, suivie d'un repos de 12 heures à 4° C, il obtenait des cristaux, purifiés par lavages dans l'éthanol, l'acétone et l'éther. Ces cristaux donnaient $F = 291^{\circ}-293^{\circ} \text{ C}$ avec décomposition et brunissement dès $280^{\circ}-285^{\circ} \text{ C}$.

Puis en 1958, VON EULER (1958, b) préparait le N-Oxyde de nicotinamide sur le même principe, mais en employant une quantité plus faible d'acide acétique, et en opérant à 65° C , pendant 48 heures. Il obtenait ainsi, après purification et séchage sous vide, des cristaux dont le $F = 287-288^{\circ} \text{ C}$. L'auteur a préparé de même les N-oxydes d'acide nicotinique et iso-nicotinique (VON EULER 1959, a et b).

Des chercheurs japonais avaient déjà préparé le N-Oxyde de nicotinamide en employant d'autres méthodes :

- a) hydrolyse alcaline du nicotinonitrile-1-oxyde (JUJO 1946)
- b) action de l'ammoniaque sur le méthyl-nicotinate-1-oxyde (SHIMIZU (1952)

et trouvaient $F = 275^{\circ} - 276^{\circ} \text{ C}$.

2. Etat physique

La nicotinamide se présente sous forme d'une poudre blanche, cristalline, inodore, à saveur fraîche puis amère, $F = 128^{\circ}-130^{\circ} \text{ C}$. Elle est assez soluble dans l'eau, l'alcool et le chloroforme, peu soluble dans l'éther, selon le Codex 1965.

Par contre, le N-Oxyde de nicotinamide a l'aspect de paillettes blanches, $F = 275^{\circ} \text{ à } 293^{\circ} \text{ C}$, selon les auteurs. Il est plus soluble dans l'eau que la nicotinamide, un peu moins soluble dans le chloroforme et très peu soluble dans le méthanol (VON EULER 1958, b) ce qui se justifie par son caractère basique diminué et hydrophile accru, du fait de la liaison semi-polaire N-O qui s'est ajoutée à la molécule initiale de nicotinamide.

3. Spectre Ultra-Violet

Nous avons regroupé les données les plus caractéristiques de la littérature antérieure sous forme de tableau :

Auteur	Solvant	Nicotinamide		Nicotinamide-N-Oxyde	
		$\lambda_{\text{min.}}$	$\lambda_{\text{max.}} (E \frac{1\%}{1 \text{ cm}})$	$\lambda_{\text{min.}}$	$\lambda_{\text{max.}} (E \frac{1\%}{1 \text{ cm}})$
KUHN (1936)	eau	244 nm	260 nm		
HOCHBERG (1945)	tampon NaHCO_3 pH=9,7		262 nm (238)		
CIUSA (1959)	NaCl (0,1 N) pH = 6,7		261 nm (480)		
	HCl (0,1 N) pH = 1,1		261 nm (330)		
	NaOH (0,1 N) pH = 13		261 nm (300)		
VON EULER (1959)	eau	245 nm	257 nm	240 nm	267 nm
COLOMBATTI (1965)	eau		261,5 nm (237)		

Cependant, BONAVITA (1961) ne semble pas en accord avec CIUSA (1959), car il a montré que le coefficient d'absorption augmentait lorsque le pH s'élevait.

Il faut aussi signaler les intéressants travaux d'ABELSON (1963) qui étudia les spectres U.V. de la nicotinamide et de son N-Oxyde, avant et après irradiation à 253 nm. L'auteur constate que l'irradiation fait disparaître le pic situé aux environs de 260 nm, dans la nicotinamide et son N-Oxyde -pic dû au noyau pyridinique- et fait apparaître un pic à 330 nm dans le deuxième cas.

Continuant ses travaux, ABELSON (1965) a cherché à identifier par chromatographie les produits de transformation. Il a montré ainsi que :

- la nicotinamide donnait de l'acide nicotinique et un produit inconnu,
- le N-Oxyde de nicotinamide donnait de la nicotinamide et plusieurs autres produits, non identifiés.

4. Spectre Infra-Rouge

Il semble que le seul auteur qui ait étudié le N-Oxyde de nicotinamide par spectrophotométrie dans l'I.R. soit BONAVITA (1961). Le spectre est réalisé dans l'eau lourde (D_2O). Nous n'avons aucune référence concernant le spectre I.R. de la nicotinamide elle-même.

5. Réactions chimiques et réactions colorées d'identification

On peut identifier le N-Oxyde de nicotinamide en le réduisant en nicotinamide. Pour cela VON EULER (1959, c) propose une méthode générale, basée sur l'action de l'acide ascorbique, en solution méthanolique, sur une solution éthanolique de N-Oxyde. Il propose aussi l'emploi de la "réductone" qui est l'acide émol-tartronique.

Par ailleurs, WIELAND (1963) obtient la réduction du N-Oxyde, dans le méthanol, par l'hydrogène catalysé sur du nickel de Raney. Il ne reste plus qu'à caractériser la nicotinamide ainsi formée.

D'après le Codex 1965, il suffit de chauffer 20 mg de nicotinamide avec 5 ml de soude à 15 %, pour obtenir l'hydrolyse de la fonction amide, avec libération d'ammoniaque facilement reconnaissable. De même, si l'on chauffe à sec 10 mg de nicotinamide, on perçoit bientôt l'odeur désagréable de pyridine.

Parmi les réactions colorées de la nicotinamide, il faut en distinguer plusieurs types, basés sur des principes différents :

a) Réaction au bromure de cyanogène : les trois réactions suivantes sont caractéristiques du noyau pyridinique et dérivent des travaux de KOENIG (1904) :

- Le Codex 1965 signale que, sous l'action du bromure de cyanogène à chaud, suivie de refroidissement et d'addition de sulfanilamide en milieu chlorhydrique, la nicotinamide produit une coloration jaune d'or.
- HUEBNER (1951) révèle la nicotinamide sur des bandes de papier de chromatogramme, en les soumettant 15 mn aux vapeurs du bromure de cyanogène, puis en les pulvérisant avec une solution diluée de benzidine dans l'éthanol. Dans ces conditions, la nicotinamide donne un spot rouge-violet, pour des quantités supérieures à 5 μ g.
- REDDI (1953) opère de façon analogue, mais après action du bromure de cyanogène, pendant 1 heure, il pulvérise une solution alcoolique d'acide p-aminobenzoïque, qui produit une fluorescence jaune sous U.V., en présence de nicotinamide.

b) Réactions au cyanure de potassium :

Celui-ci se fixe en para de l'atome d'azote sur le noyau pyridinique, à condition qu'il soit substitué en 1 et en 3. La réaction est différente suivant que l'on opère en milieu aqueux ou en milieu éthanolique (COLOWICK 1951, LAMBORG 1957 et 1958). Il s'agirait d'une addition nucléophile

bimoléculaire, qui serait favorisée en milieu solvant moins ionisant que l'eau (LAMBORG 1957). Cette réaction a pu permettre de caractériser certains métabolites de la nicotinamide, parmi lesquels les dérivés N-méthylés (BONAVITA 1961). La fixation de l'anion CN^- se manifeste par une fluorescence et une modification du spectre U.V.

c) Réaction au 2-4-dinitrochlorobenzène :

Il se produit une réaction d'addition sur la nicotinamide conduisant à la formation d'un composé coloré. Ainsi, SIMATOEPANG (1959) utilise ce réactif en solution alcoolique diluée, qu'il pulvérise sur un chromatogramme, soumis ensuite à un chauffage de 30 mn à l'étuve à 110°C. La coloration est alors développée par addition de potasse alcoolique. DANILOVICH (1966) se base sur le même principe, mais utilise la soude au lieu de la potasse.

d) Réaction au sulfate de cuivre :

Selon GUVEN (1966), la nicotinamide donne avec un mélange de sulfate de cuivre et d'ammoniaque une réaction analogue à celle de la Coramine, se révélant par une coloration bleu-vert sur des chromatogrammes (sur couches minces).

e) Réaction à l'hydroxylamine et au perchlorure de fer :

Sous l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine en milieu méthanolique et à chaud, la nicotinamide se transforme en un acide hydroxamique, que l'on révèle par une solution éthanolique de perchlorure de fer. Il se produit une coloration rouge avec la nicotinamide et diverses amides (ROBERTSON 1964). Cette réaction est intéressante sur un chromatogramme, car elle trouve sa spécificité grâce au R_f du spot.

f) Réaction de diazotation :

BONAVITA (1961) signale la possibilité d'utiliser la réaction de HOLMAN (1954) sur des chromatogrammes d'urine, pour rechercher la nicotinamide et ses métabolites. Cette réaction utilise, dans un premier temps, la classique préparation d'une amine à partir d'une amide, en présence d'hypobromite de sodium suivant la seconde méthode d'HOFFMAN.

Puis, dans un second temps, on diazote l'amine, et on couple le produit formé avec une amine aromatique, le dichlorhydrate de N-naphtyl-éthylène-diamine. BONAVITA (1961) a obtenu ainsi des spots roses, avec la N-méthyl-nicotinamide, la nicotinamide et son N-Oxyde, et un spot pourpre avec la N-méthyl-pyridone-carboxamine.

6. Séparation chromatographique

a) Chromatographie sur papier :

La plupart des auteurs utilisent le papier Whatman N° 1, à l'exception toutefois de CHAYKIN (1959) et de son équipe (BONAVITA 1961 et MURRAY 1966) qui emploient le papier Whatman 3 MM. Ces auteurs ont essayé successivement divers solvants, avec lesquels ils obtiennent les résultats ci-dessous :

	Nicotinamide	Nicotinamide-N-Oxyde
Butanol saturé d'eau	Rf: 0,60	Rf: 0,23
Butanol saturé d'eau / acide acétique (60 : 1)	Rf: 0,70	Rf: 0,32
Butanol saturé d'ammoniaque à 3 %	Rf: 0,69	Rf: 0,31
Acétone/Eau (7:3)	Rf: 0,87	Rf: 0,69
Butanol/Acide acétique / Eau (4:1:1)	Rf: 0,70	Rf: 0,45

Par la suite CHAYKIN (1965) a travaillé sur papier Whatman N° 1, avec le butanol saturé d'ammoniaque à 3 % et a obtenu des Rf un peu différents : 0,79 et 0,30 pour la nicotinamide et son N-Oxyde, respectivement.

Parmi les solvants qui ont servi à développer des chromatogrammes contenant de la nicotinamide, citons encore :

Solvants	Rf de la nicotinamide	Auteurs
Butanol saturé d'ammoniaque 1,5 N	0,65	HUEBNER (1951)
Butanol saturé d'eau	0,69	REDDI (1953)
Propanol-eau (8:2)	0,72	HOLMAN (1954)
Acétone-eau (8:2)	0,80	COLOMBATTI (1965)
Alcool amylique-acétone-eau (6:3:3)	Rf non précisé	DANILOVIC (1966)

b) Chromatographie sur couches minces :

On a pu utiliser des plaques de verre recouvertes de cellulose ou de silicagel G.

GUVEN (1966) propose deux systèmes solvants, avec des plaques de Silicagel G :

- Butanol-acide acétique-eau (10:2:1,5) $R_f = 0,65$ pour la nicotinamide.
- Propanol-ammoniaque à 10 %-glycérol (20:5:5) $R_f = 0,76$ pour la nicotinamide.

DITTMAN (1967) souligne l'intérêt des plaques de cellulose pour séparer diverses vitamines dont la nicotinamide, avec le solvant:propanol-acétate d'éthyle-ammoniaque (5:3:2).

c) Chromatographie en phase gazeuse :

Un travail récent, dû à PROSSER (1968), a montré que l'on pouvait doser la nicotinamide par chromatographie en phase gazeuse, avec une précision de l'ordre de 10 ng.

7. Dosage de la nicotinamide

De nombreuses méthodes de dosage de la nicotinamide ont été proposées au cours des années antérieures. Néanmoins on peut retenir deux grands groupes : - méthodes microbiologiques

- méthodes chimiques.

Les méthodes microbiologiques comportent, classiquement, la mesure du pouvoir de multiplication de "Proteus Morgani" au néphélomètre, ou la formation d'acide lactique par "Lactobacillus Arabinosus". Nous ne nous y sommes pas attardé, préférant étudier de près les méthodes chimiques, afin de nous en inspirer pour nos propres dosages ultérieurement. Nous retrouverons ici des applications quantitatives des réactions colorées précédemment citées :

a) Méthodes de dosage employant le bromure de cyanogène :

La première méthode est due à D'ALESSIO (1958) qui fait agir du bromure de cyanogène sur la nicotinamide au bain-marie, et après refroidissement et alcalinisation, observe une fluorescence bleue, sensible à $2 \mu\text{g}$ de produit.

Afin d'obtenir des résultats mesurables par colorimétrie, il a fallu modifier un peu la réaction. Ainsi PELLETIER (1961), opère sur une solution de nicotinamide diluée dans du tampon phosphate diacide de potassium qu'il laisse en contact 30 mn avec du bromure de cyanogène, avant d'ajouter l'acide barbiturique, dilué également dans du tampon phosphate, qui donne une coloration photométrable à 550 nm.

Puis en 1966, MESNARD a mis au point une méthode analogue, où l'acide thiobarbiturique remplace l'acide barbiturique. Le principe réside dans la création, sous l'action du bromure de cyanogène, d'une fonction nitrile, que l'on transforme en aldéhyde; celui-ci perd son oxygène avec les deux atomes d'hydrogène mobiles du chaînon malonyl-, donnant naissance à une structure chromophore.

Pour mémoire, nous citerons également d'autres méthodes colorimétriques utilisant le bromure de cyanogène, mais servant à doser l'acide nicotinique, qui peut être obtenu comme produit d'hydrolyse, acide ou alcaline, de la nicotinamide (MUELLER 1951).

Ainsi, appliquant la méthode de BANDIER (1939), PERLZWEIG (1940) et DANN (1941), puis ELLINGER (1949) font agir du métol (sulfate de para-méthyl-aminophénol) en milieu acide; MUELLER (1951) utilise un réactif ammoniacal en solution tamponnée (phosphate monopotassique) qui donne une coloration avec un maximum d'intensité à 408 nm; D'ALESSIO (1958) travaille avec divers agents alcalins tels que les hydroxydes de sodium, de potassium et de calcium, ou bien encore le carbonate de sodium; WRONSKA-NOFER (1966) emploie l'aniline, appliquant ainsi directement la réaction de KOENIG (1904), qu'il colorimètre à 460 nm.

b) Méthodes de dosage employant le cyanure de potassium :

Une technique fluorimétrique, basée sur la réaction d'addition du cyanure de potassium sur la nicotinamide, a été décrite par MESTRES (1962). Cette méthode est sensible au μg et peut par conséquent trouver son application dans les études de métabolisme. Elle consiste, dans un premier temps, à fixer le cyanure de potassium en milieu alcalinisé par la potasse et le carbonate acide de potassium, puis à faire agir la chloramine T. Après une heure de contact, il se produit une fluorescence, que l'on mesure à 462 nm.

c) Méthode de dosage utilisant l'hydroxylamine et le perchlorure de fer :

Il s'agit ici de photométrer, entre 500 et 570 nm, la coloration rouge produite sous l'action du perchlorure de fer en milieu chlorhydrique, par l'acide hydroxamique, obtenu à partir de la nicotinamide traitée par l'hydroxylamine en milieu alcalin (BERGMANN 1952).

Il faut savoir que diverses autres amides, ainsi que des esters ou anhydrides d'acides, peuvent interférer, mais les temps et les températures de réaction sont alors très différents.

d) Méthodes de diazotation :

La méthode de HOLMAN (1954) citée à propos de la mise en évidence de la nicotinamide, peut être appliquée à une détermination quantitative, en photométrant à 500 nm la coloration rose-orangée obtenue dans une gamme de concentration variant de 5 à 50 μ g par prise d'essai.

e) Titrimétrie en milieu anhydre :

Cette méthode, décrite par WIMER (1962), s'applique au dosage des N-Oxydes de la série pyridinique, et en particulier au N-Oxyde de nicotinamide. Elle consiste à dissoudre l'échantillon (environ 1/1000 Mole) dans l'anhydride acétique, et à le titrer par l'acide perchlorique (0,1 N) dans le dioxanne, en opérant dans un appareil automatique avec électrode de verre au calomel, modifiée.

f) Méthodes fluorimétriques :

Signalons enfin deux méthodes de dosage de la N₁-méthyl-nicotinamide, qui ne nous concernent pas directement, mais qui sont utilisées par les auteurs s'intéressant au métabolisme de la nicotinamide. Il s'agit de l'équipe de ELLINGER (1944 et 1949) et de COULSON (1944), qui ont mis à profit l'existence d'une fluorescence de la N₁-méthyl-nicotinamide en milieu alcalin dans l'isobutanol. Cette fluorescence a également été observée par KLEIN (1942) dans le butanol, et par HUFF (1947) dans l'acétone.

III - ETUDE DU METABOLISME DE LA NICOTINAMIDE

Le métabolisme de la nicotinamide, substance vitaminique importante par sa présence à l'intérieur de divers co-enzymes, a été très étudié. Nous nous sommes attaché, dans l'esprit de ce travail, à rassembler toutes les données susceptibles d'éclairer le problème de l'élimination de la nicotinamide sous forme de N-Oxyde, laissant volontairement dans l'ombre l'étude détaillée des divers autres métabolites.

a) Les expériences réalisées in-vivo, chez l'homme et l'animal, ont donné des résultats variables selon les auteurs, et souvent contradictoires. Nous essayerons d'en fournir ici un aperçu assez rapide.

En 1942 HUFF, administrant 1,5 mg de nicotinamide, chez le rat, per os, en retrouva dans les urines 30 % sous forme de trigonelline (qui est la bétaine de l'acide N₁-méthyl-nicotinique) et 5 % sous forme inchangée.

Puis ELLINGER (1944 et 1949) et COULSON (1946) ont étudié son métabolisme chez l'homme et chez l'animal. Ils ont trouvé qu'une dose de 100 mg de nicotinamide, par voie orale, chez l'homme, amenait une élimination urinaire de 18,9 % de N₁-méthyl-nicotinamide, tandis que chez le cobaye, traité par 100 à 400 mg de nicotinamide, l'élimination urinaire se faisait pour environ 35 % de la dose ingérée, sous forme d'acide nicotinique. Donc l'homme "méthyle", tandis que le cobaye "désamine" la nicotinamide pour l'éliminer.

Des essais réalisés par LEIFER (1951) sur divers mammifères, auxquels il administra de la nicotinamide, marquée au ¹⁴C, par voie parentérale, aboutirent aux résultats suivants, en ce qui concerne la répartition des divers métabolites, exprimés en % de radioactivité excrétée :

	Chien	Rat	Hamster	Souris
N-méthyl-nicotinamide	94	73,5	35	20
Acide nicotinurique	0,5	0	0	0,5
Acide nicotinique	1	5,5	17	36,2
Produit X	1	3,5	13	9
N-méthyl-pyridone-carboxamide	2,5	12	10	20
Nicotinamide inchangée	1	5,5	25	14,3

Puis, en 1953, REDDI entreprit l'étude du métabolisme de l'acide nicotinique et de la nicotinamide, chez l'homme et chez le rat, normal ou carencé en vitamine PP. En ce qui concerne la nicotinamide, administrée à raison de 100 mg, par voie orale, chez l'homme, elle se retrouve métabolisée en 3 heures dans les urines, sous forme de N₁-méthyl-nicotinamide (7 à 16 mg), et de nicotinamide (0,9 à 1,8 mg); chez le rat normal, l'excrétion urinaire de 24 heures, après administration de 2,5 mg de nicotinamide est constituée, en % de la dose ingérée, par 70 % de N-méthyl-nicotinamide, 18 % de nicotinamide et 4,6 % d'acide nicotinique.

En ce qui concerne l'existence du N-Oxyde comme métabolite de la nicotinamide, elle fut découverte chez le rat par CHAYKIN (1959), qui depuis lors n'a pas cessé de s'intéresser avec son équipe (BONAVITA 1961, CHAYKIN 1965, MURRAY 1966), au rôle possible de ce N-Oxyde.

La première expérience de CHAYKIN, en 1959, n'était que qualitative. Après administration de nicotinamide, marquée au ¹⁴C sur le carbone 7, à des rats, par voie intra-péritonéale, l'auteur les sacrifiait et réalisait un extrait, à partir du foie et des surrénales, qu'il soumettait à l'analyse en chromatographie sur papier. Puis, après avoir détecté les spots sous lumière U.V., il les éluait, et retrouvait au niveau de la nicotinamide et de son N-Oxyde, la totalité de la radioactivité.

Puis, en 1961, BONAVITA travaillant dans des conditions analogues sur des souris auxquelles il injectait de la nicotinamide, marquée au ¹⁴C sur le carbone 7, par voie intra-péritonéale, dosait alors les métabolites

dans l'urine, au moyen de la radioactivité émise par les différents spots en chromatographie. Ainsi, après 12 heures, il retrouvait 0,45 % de la dose sous forme de nicotinamide, 0,38 % sous forme de N-Oxyde, et 0,07 % sous forme de N₁-méthyl-nicotinamide et acide nicotinique.

En 1955, CHAYKIN reprenait ces travaux sur les souris. Après injection de nicotinamide marquée au ¹⁴C, par voie intra-péritonéale ou intragastrique, il trouvait que le % de la radioactivité émise dans les urines de 10 heures, se répartissait comme suit : 51 % de N-Oxyde, 30 % de nicotinamide, 7,9 % de N-méthyl-nicotinamide-acide nicotinique-acide nicotinurique, et 12 % de N₁-méthyl-carboxamide-3 pyridone-4 (ou 6).

Après administration, per os, de nicotinamide marquée au ¹⁴C à des souris normales ou carencées, il obtient les résultats suivants :

- pour une dose journalière de 25 g, administrée à des souris carencées, on retrouve dans les urines, après 4 h., 0,82 % de la radioactivité administrée, dont 0,158 % de nicotinamide et 0,33 % de N-Oxyde de nicotinamide.
- pour une dose de 50 g administrée dans les mêmes conditions, mais à des souris normales, on retrouve 1,2 % de la radioactivité, dont 0,168 % de nicotinamide et 0,42 % de N-Oxyde de nicotinamide.

En étudiant chez des souris carencées, la répartition de la radioactivité, émise dans les urines entre 10 et 60 mn, après l'injection de nicotinamide-¹⁴C, cet auteur trouvait que le taux de nicotinamide diminuait de 47 à 13 %, tandis que s'élevait simultanément le taux du N-Oxyde de 36 à 47 %, ce qui plaide en la faveur d'une transformation, au moins partielle, de la nicotinamide ingérée, en N-Oxyde de nicotinamide dans l'organisme.

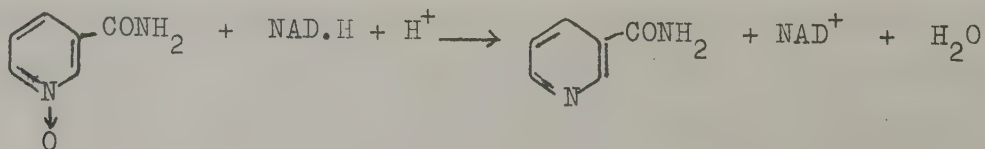
Ces derniers résultats semblent plus dignes de foi, car ils sont basés sur des méthodes précises de dosage de la radioactivité, tandis que les travaux plus anciens reposaient surtout sur des dosages colorimétriques ou fluorescimétriques, souvent assez peu spécifiques lorsqu'on les applique à l'urine et non à des éluats chromatographiques purs. Il apparaît ainsi que, chez la souris tout au moins, une très faible partie seulement de la nicotinamide ingérée se retrouve dans les urines. Ceci laisse penser à un

important stockage tissulaire, parfaitement compatible avec le rôle de la nicotinamide dans les co-enzymes du métabolisme intermédiaire.

b) D'autres expériences furent réalisées in-vitro. Les premières sont dues à CHAYKIN (1959) : du N-Oxyde de nicotinamide marqué au ^{14}C mis en présence d'homogénat de foie de porc, se transforme en nicotinamide, ce qui fut mis en évidence par chromatographie, par le point de fusion du picrate et par le spectre U.V. Il convient d'ajouter que la transformation inverse, dans un tel milieu, n'avait pas eu lieu.

Par contre KIRCHNER (1966) a fait incuber des tranches de divers organes de souris (foie, rein, poumon, coeur, rate, cerveau) avec de la nicotinamide et il a pu montrer que la transformation en N-Oxyde était maximale en présence de foie et accessoirement de la rate (pour laquelle il retrouvait environ le quart de l'activité du foie). Selon l'auteur, qui a travaillé ensuite sur les foies de divers autres mammifères (poulet, dinde, boeuf, porc, rat, souris, lapin), la transformation en N-Oxyde serait due à un système enzymatique microsomal hépatique, actif en présence de TPNH et d'oxygène moléculaire; ceci, uniquement pour les trois dernières espèces citées, les autres s'étant révélées inactives.

Travaillant dans la même équipe, MURRAY (1966, b, c, d) a étudié de plus près le système enzymatique du foie de porc responsable de la réduction du N-Oxyde de nicotinamide, en marquant la molécule au ^{14}C et en dosant la nicotinamide sur des éluats de chromatographie, soit par mesure radioactive directe dans un compteur à scintillation, soit par colorimétrie à 398 nm de la réaction au bromure de cyanogène en présence d'ammoniaque, en milieu tamponné par du phosphate monopotassique (MUELLER 1951). L'auteur conclut que le réducteur pouvait être soit du NADH, soit un composé de faible poids moléculaire, contenu dans le surnageant du foie de porc bouilli purifié, dont on augmente l'activité environ 280 fois par passage sur carboxyméthylcellulose :



Puis il constata que la xanthine, l'hypoxanthine et la N₁-méthyl-nicotinamide, pouvaient fonctionner comme agents de réduction sur le N-Oxyde de nicotinamide, ce qui lui laissa envisager un rôle possible de la xanthine-oxydase. Diverses expériences confirmèrent cette hypothèse : ainsi l'enzyme inconnue et la xanthine-oxydase manifestent la même sensibilité à la chaleur et aux inhibiteurs tels que le cyanure. La fraction enzymatique purifiée à partir du foie de porc a, de plus, le spectre d'une métalloflavoprotéine, et possède la même activité que la xanthine-oxydase du foie ou du lait.

L'auteur suggère que les N-Oxydes représenteraient une classe unique d'oxydants vis-à-vis des réactions catalysées par la xanthine-oxydase. Ceci laisse supposer que cet enzyme serait capable de réduire d'autres N-Oxydes, comme ceux de la pyridine et de l'acide nicotinique.

Poursuivant son étude, MURRAY eut recours au marquage radioactif à l'¹⁸O sur le N-Oxyde de nicotinamide, sur H₂O et sur O₂. En mesurant le nombre d'atomes d'oxygène radioactif incorporés dans l'acide urique, il aboutit aux résultats suivants, avec la xanthine-oxydase du lait :

- xanthine-oxydase + xanthine + H₂O* + N-Oxyde de nicotinamide → 0,43 atome d'¹⁸O* dans l'acide urique.

- xanthine-oxydase + xanthine + H₂O + N-Oxyde* de nicotinamide → 0,54 atome d'¹⁸O* dans l'acide urique.

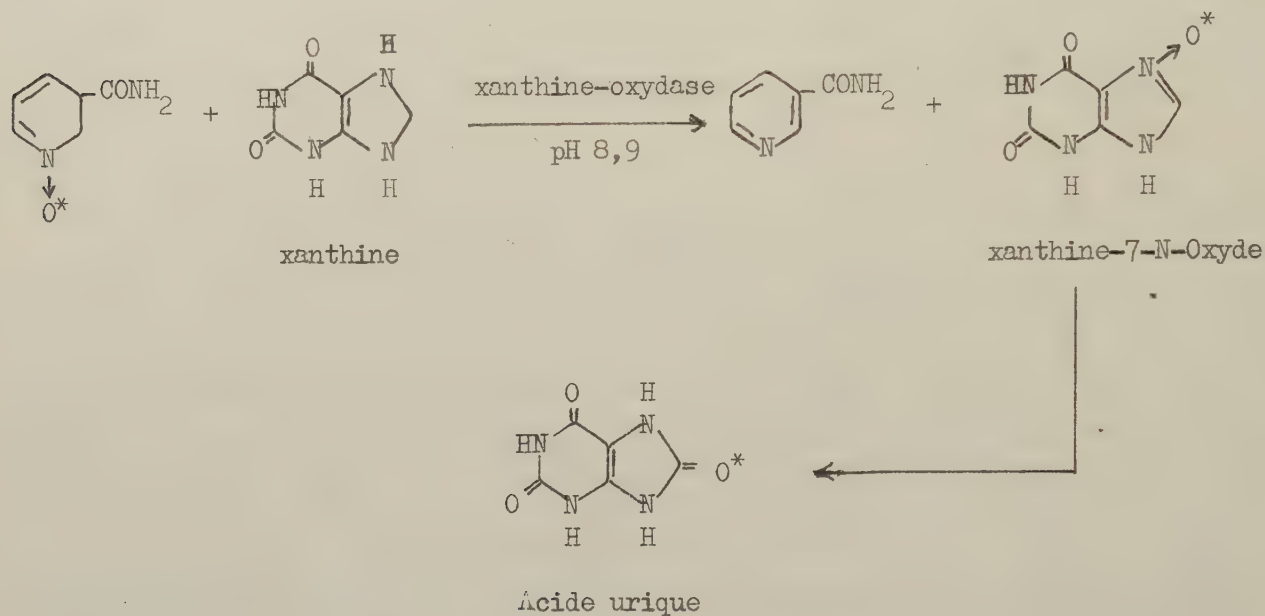
- xanthine-oxydase + xanthine + H₂O* + O₂ → 0,83 atome d'¹⁸O* dans l'acide urique.

- xanthine-oxydase + xanthine + H₂O + O₂* → 0

MURRAY (1966) arrive ainsi à la conclusion que la xanthine-oxydase peut fonctionner :

- soit dans les transferts d'électrons, impliquant l'addition d'une molécule d'eau et la perte de deux électrons de la xanthine.

- soit dans les transferts directs d'oxygène de l'agent oxydant (oxygène ou nicotinamide-N-Oxyde) sur la xanthine, pour former l'acide urique. Dans le cas où le N-Oxyde de nicotinamide est l'agent oxydant, on suppose qu'il se formerait un N₇-Oxyde de xanthine, intermédiairement, car il existe un phénomène analogue en ce qui concerne le N-Oxyde de pyridine :



L'auteur pense que les N-Oxydes hétérocycliques, représentés ici par le N-Oxyde de nicotinamide, ont des propriétés particulièrement adaptées aux opérations d'oxydation biologiques.

Par ailleurs, l'étude comparée des propriétés vitaminiques de la nicotinamide et de son N-Oxyde, ont montré, soit une activité analogue (DI ROSA 1965), soit une activité légèrement inférieure vis-à-vis de diverses souches de bactéries (TATSUMI 1961).

Enfin récemment, par des méthodes manométriques, l'effet inhibiteur du N-Oxyde de nicotinamide, sur la monoaminoxidase, a été mis en évidence sur des mitochondries, obtenues à partir du cerveau de rat (NANTKA-NAMIRSKI 1966).

IV - CONCLUSION

L'étude des propriétés physico-chimiques et du métabolisme de la nicotinamide, ont permis de mettre en évidence le rôle important joué par le N-Oxyde de nicotinamide dans l'organisme, rôle qui reste encore à approfondir, mais qui semble pouvoir être étendu en ce qui concerne les phénomènes d'oxydation biologique, aux divers N-Oxydes hétérocycliques, susceptibles de se retrouver in-vivo, soit naturellement, soit après administration de diverses substances thérapeutiques.

Deuxième Partie

TRAVAUX PERSONNELS SUR LA

NICOTINAMIDE

L'étude des travaux antérieurs concernant la nicotinamide nous ayant révélé l'existence d'un dérivé N-Oxyde dans l'urine des mammifères, après ingestion de cette substance vitaminique, nous avons voulu néanmoins procéder à une vérification des données de la littérature, qui provenaient toutes de la même équipe de chercheurs (CHAYKIN 1959 et 1965, BONAVIDA 1961, MURRAY 1966).

Pour cela, nous avons commencé par synthétiser le N-Oxyde de nicotinamide puis nous avons étudié ses diverses propriétés physico-chimiques, avant de passer aux essais chez l'animal.

§

I - SYNTHÈSE DU N-OXYDE DE NICOTINAMIDE

Nous avons appliqué la méthode décrite par VON EULER (1958 b), et qui consiste en une oxydation de la nicotinamide par l'eau oxygénée concentrée, en milieu acétique.

Les opérations ont été conduites avec le même appareillage que celui décrit à l'occasion de la synthèse de TMAO.

Dans un premier temps, nous avons dissous la nicotinamide (1,6 g) dans l'acide acétique cristallisable (8 ml), puis nous avons ajouté peu à peu de l'eau oxygénée concentrée, à 100 volumes (4 ml). Le ballon contenant

le mélange en réaction, a été placé dans un bain de sable chauffé électriquement à 65° C, pendant 48 heures, en agitant de temps à autre.

Après cela, nous avons ajouté un peu de noir de platine, afin d'éliminer un éventuel excès d'eau oxygénée; puis après une heure de contact, nous l'avons éliminé par centrifugation.

La liqueur restante fut alors concentrée sous pression réduite, à une température voisine de 60° C, dans l'évaporateur rotatif. Nous avons obtenu finalement un résidu sec, en petits grains jaune-pâle.

Celui-ci, repris par 3 ml d'eau distillée chaude (60° C), est ensuite refroidi dans de la glace pilée, et l'on gratte les parois du récipient avec une baguette de verre afin d'amorcer la cristallisation, que l'on laisse se poursuivre pendant une heure au réfrigérateur à -15° C.

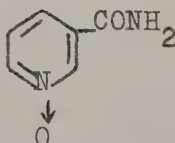
Au bout de ce temps, il s'est formé des cristaux, que l'on sépare par filtration sur entonnoir de BUCHNER. Ces cristaux sont lavés avec un très petit volume d'eau glacée, puis séchés dans un exsiccateur sous vide poussé (1 mm Hg) en présence de P₂O₅.

On obtient finalement des cristaux blancs, en paillettes, très légers, se distinguant très nettement de la nicotinamide initiale qui se présentait sous forme pulvérulente blanche.

L'analyse élémentaire du produit synthétisé donne les pourcentages suivants des divers éléments :

C %	51,99	H %	4,36	O %	22,98	N %	20,12
	52,41		4,42		23,10		

Ils conduisent à la formule brute : C₆H₆N₂O₂, qui correspond au N-Oxyde de nicotinamide, non hydraté :



Nous devons ces résultats au laboratoire de micro-analyse détaché du C.N.R.S., à la nouvelle Faculté des Sciences de Lyon.

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les cristaux synthétisés précédemment, sont alors identifiés par leur point de fusion, leurs spectres U.V. et I.R., leur comportement chromatographique, leur réductibilité en nicotinamide, confirmés par la micro-analyse élémentaire. Dans la mesure du possible, nous avons essayé d'établir un parallèle entre les propriétés de la nicotinamide et de son N-Oxyde.

a) Point de fusion : Le point de fusion instantané de la nicotinamide est de 129°C d'après le Codex 1965; en ce qui concerne notre N-Oxyde de nicotinamide nous trouvons $F = 290^{\circ}\text{C}$, ce qui est assez voisin des chiffres de TAYLOR (1957) de VON EULER (1958 b).

Nous avons transformé le N-Oxyde en picrate, par action d'une solution alcoolique concentrée d'acide picrique. Les cristaux jaunes obtenus ont $F\text{ inst.} = 154^{\circ}\text{C}$.

Contrairement à la plupart des N-Oxydes, celui de la nicotinamide ne semble pas hygroscopique, et de plus cristallise pur, sans molécule d'eau (confirmé par micro-analyse), ce qui explique la forte augmentation de son point de fusion par rapport à celui de la nicotinamide de départ. La liaison semi-polaire, -donc partiellement ionique-, apportée par le groupement $\text{N} - \text{O}$, consolide l'édifice moléculaire et le rend plus difficile à détruire par la chaleur, ce qui se manifeste par un point de fusion nettement plus élevé.

b) Solubilités : Le N-Oxyde de nicotinamide synthétisé par nos soins, est très soluble dans l'eau chaude; soluble dans l'eau froide, l'éthanol bouillant, et le méthanol; peu soluble dans l'éthanol à température ordinaire; insoluble dans le benzène, l'éther éthylique, et le cyclohexanne.

D'une façon générale, la solubilité du N-Oxyde dans les solvants polaires est accrue par rapport à la nicotinamide.

c) Spectre Infra-Rouge : N'ayant pas trouvé dans la littérature de données concernant les spectres I.R. de la nicotinamide ou de son N-Oxyde, nous avons eu recours à une technique "par étapes", qui consiste à étudier successivement des molécules de plus en plus complexes, en partant de la structure de base du composé intéressant, pour aboutir finalement au composé lui-même.

Ainsi dans le cas présent, avons-nous étudié le spectre I.R. de la pyridine, puis de l'acide nicotinique, et enfin de la nicotinamide et de son N-Oxyde.

Les raisons déjà évoquées au chapitre concernant le TMAO, nous ont amené à utiliser ici aussi la technique du pastillage avec un halogénure alcalin.

Pour la réalisation du spectre I.R. de la pyridine, nous avons eu recours à un petit artifice, afin de ne pas souiller une cuve classique en NaCl, toujours très difficile à régénérer après usage. Dans un premier temps, nous avons préparé deux pastilles transparentes, renfermant environ 200 mg de KBr pur. Puis nous avons déposé entre elles une goutte de pyridine incolore fraîchement distillée, et après les avoir pressées ensemble, nous avons enregistré le spectre entre 700 cm^{-1} et 1900 cm^{-1} .

L'étude du spectre I.R. de la pyridine, ainsi obtenu, nous montre :

= à 1430 , 1480 , 1570 , 1590 et 1630 cm^{-1} , les bandes dues aux vibrations de valence des doubles liaisons $\text{C} = \text{C}$ et $\text{C} = \text{N}$

= à 690, 740, 1020, 1060, 1135, et 1210 cm^{-1} , les bandes dues aux vibrations de déformation et de valence C - H. Les deux bandes citées, à 690 et 740 cm^{-1} , sont caractéristiques de l'existence de 5 atomes d'hydrogène adjacents sur les atomes de carbone du noyau pyridinique.

Le spectre I.R. de l'acide nicotinique est réalisé par simple pastillage avec 0,5 mg de produit pur, pour 250 mg de KBr. On y remarque :

= à 1690 cm^{-1} , la bande due à la vibration de valence de la double liaison C = O.

= à 1400 cm^{-1} , la vibration de valence de la liaison C - O.

= à 1480, 1570, 1580 cm^{-1} , les bandes dues aux vibrations de valence des doubles liaisons C = C et C = N, du noyau.

= à 680, 730, 1020, 1070, 1100, 1170 cm^{-1} , les bandes dues aux vibrations de déformation des liaisons C - H du noyau; ces deux derniers groupes sont sensiblement identiques à ceux que l'on trouvait dans la pyridine. Les déplacements observés sont imputables à l'existence de 3 atomes d'hydrogène adjacents seulement, sur les atomes de carbone du noyau, au lieu des 5 atomes d'hydrogène adjacents dans le cas de la pyridine.

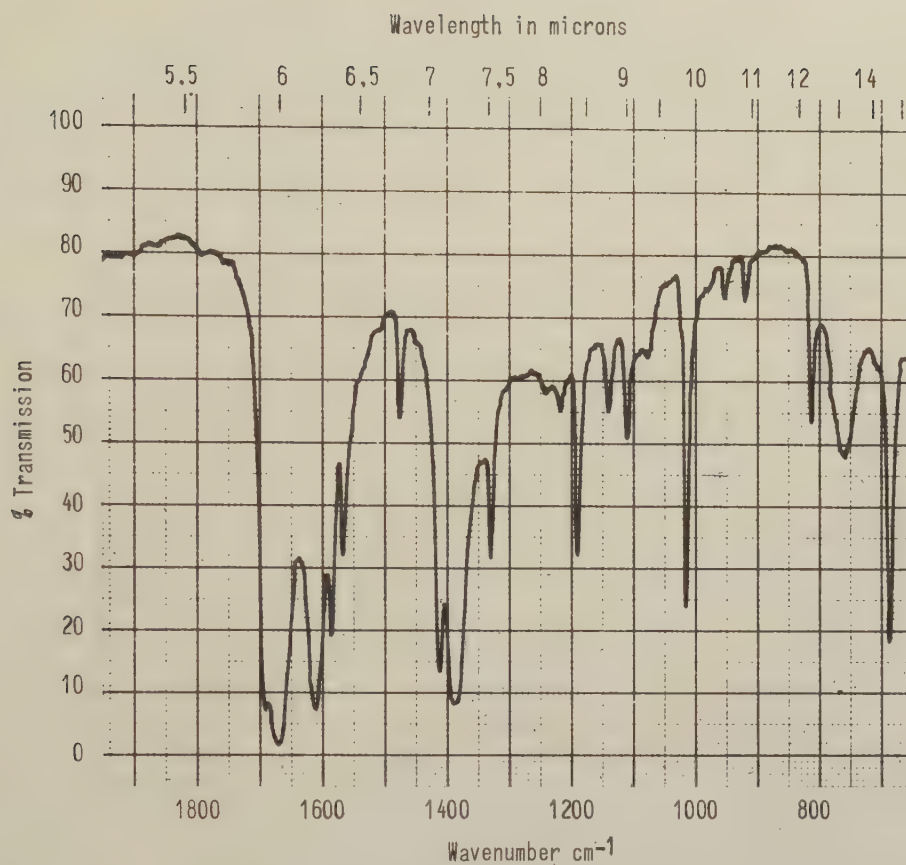
Enfin, nous avons abordé le spectre I.R. de la nicotinamide (1,1 mg pour 250 mg de KBr), et du N-Oxyde de nicotinamide (1 mg pour 255 mg de KBr), qui sont représentés ici (spectres I.R. N° 3 et N° 4).

La comparaison avec le spectre de l'acide nicotinique ou de la pyridine, est facilitée par le fait que les papiers d'enregistrement sont semi-transparents, ce qui permet de les superposer pour les étudier en parallèle.

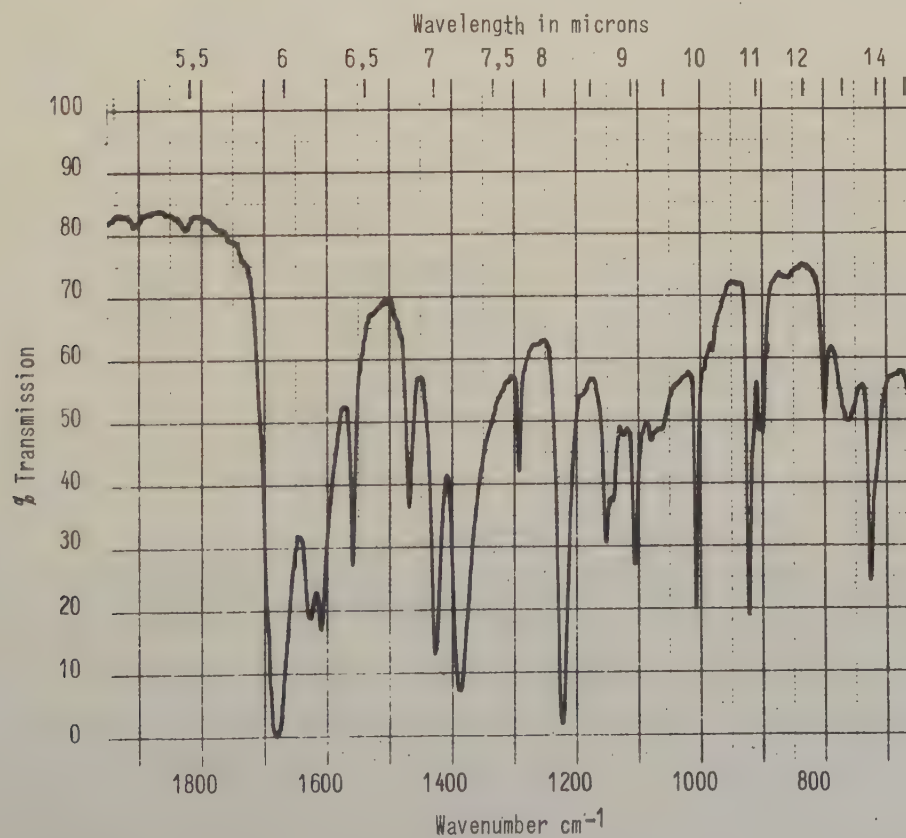
On y remarque les modifications suivantes :

- = à 1615 cm^{-1} se trouve une bande due à la vibration de déformation de la liaison N - H.
- = à 1390, 1430, 1590 cm^{-1} , les bandes dues aux vibrations de valence C - N, aliphatique.
- = à 1670 et 1690 cm^{-1} , les bandes dues aux vibrations de valence C = O, des amides primaires.
- = enfin, à 1290 cm^{-1} , pour le N-Oxyde de nicotinamide seulement, la bande due à la vibration de valence de la liaison N - O, des N-Oxydes pyridiniques.

Cette dernière constatation est un élément de plus, apporté à la caractérisation de notre produit synthétisé sous le nom de N-Oxyde de nicotinamide.

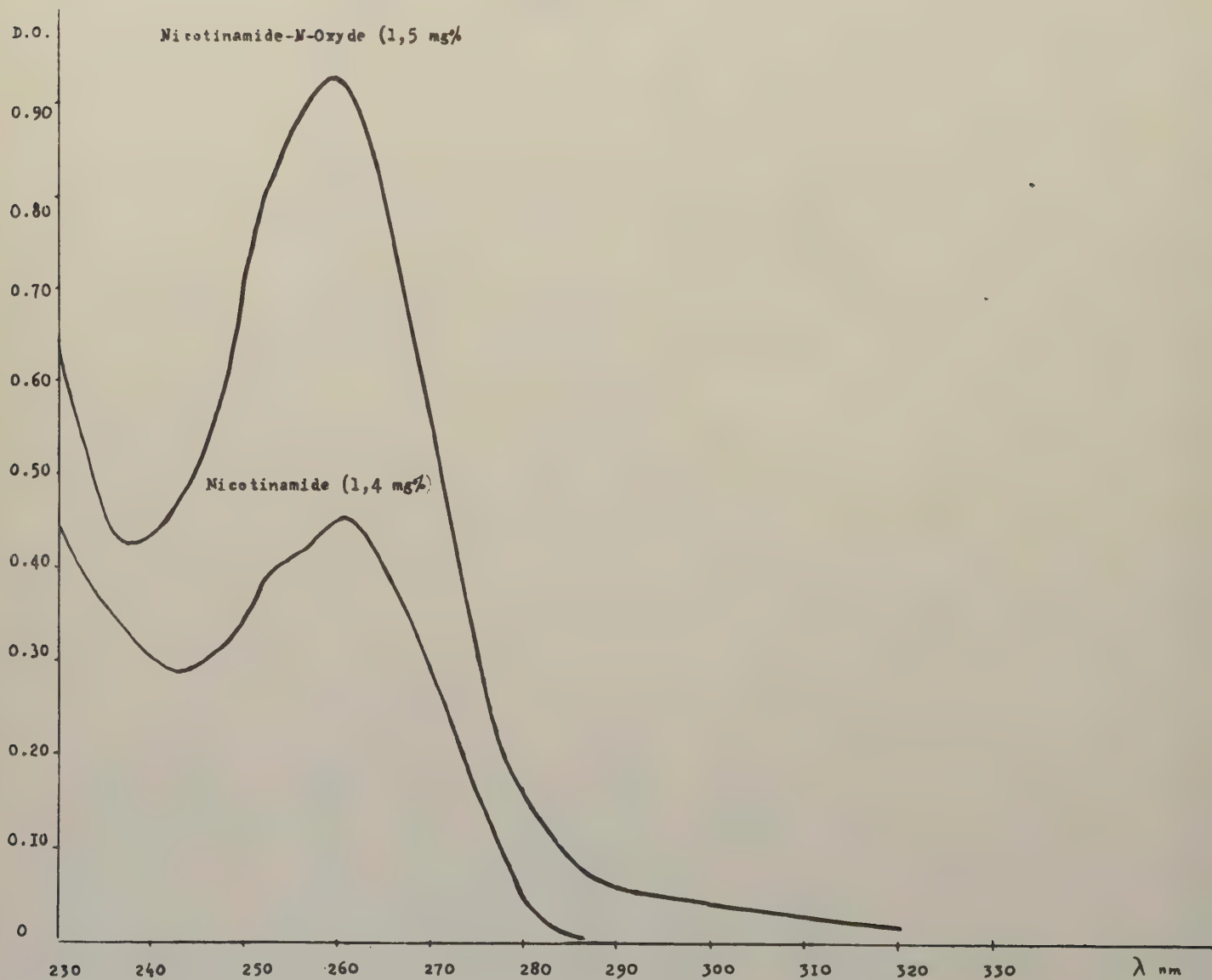


NICOTINAMIDE
SPECTRE I.R. N°3



NICOTINAMIDE N-OXYDE
SPECTRE I.R. N°4

SPECTRES U.V. DE REFERENCE - N°1 - (solvant H₂O)



d) Spectre Ultra-Violet : Les déterminations ont été réalisées sur des solutions aqueuses, assez diluées (de l'ordre de 1 mg dans 100 ml), avec un spectrophotomètre JOBIN-YVON. Les spectres U.V. de référence sont représentés ici (N° 1).

Les caractéristiques essentielles de ces spectres sont les suivantes :

	Longueurs d'onde		Coefficient d'extinction E 1 % 1 cm à λ Maximum
	λ Maximum	λ Minimum	
Nicotinamide	261-262 nm	244 nm	E = 250
N-Oxyde de nicotinamide	259-260 nm	237 nm	E = 840

On constate que l'introduction d'un groupement N-Oxyde dans la molécule de nicotinamide provoque un effet hyperchrome (c'est-à-dire une augmentation marquée du coefficient d'extinction), accompagné d'un léger déplacement hypsochrome de la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption.

e) Réactions d'identification : Nous commencerons par donner la composition et les modalités d'emploi des réactifs peu courants, que nous aurons l'occasion de mentionner par la suite dans un tableau groupant les résultats comparés obtenus en "spot-test" sur du papier Whatman, avec la nicotinamide et son N-Oxyde.

- Réaction de BICKEL (1966) : le diazo-réactif suivant est pulvérisé sur papier : p-nitraniline 0,5 g dans 50 ml HCl(N) + nitrite de sodium 0,5 g dans 50 ml d'eau distillée + 0,5 g d'acide sulfanilique dans 50 ml d'eau distillée. On termine par une pulvérisation d'HCl concentré.

- Réactif de DRAGENDORFF modifié par BILINSKI (1964) : On dissout 0,5 g de sous-nitrate de bismuth dans 1,5 ml d'acide nitrique à 30 %, et on verse le mélange peu à peu, en agitant, dans une solution renfermant 1,75 g d'iodure de potassium dans 2 ml HCl (N). Il se forme un précipité noir, qui se solubilise au fur et à mesure. On complète finalement avec HCl (N) à 50 ml.
- Réaction de DANILOVIC (1966) : On pulvérise successivement une solution de 2-4-dinitrobenzène à 1 % dans l'éthanol, puis une solution à 1 % d'hydroxyde de sodium dans l'éthanol.
- Réaction de GUVEN (1966) : le mélange à pulvériser comporte 5 volumes de sulfate de cuivre à 1 % et 1 volume d'ammoniaque à 2 %.
- Réaction d'HOLMAN (1954) : On prépare d'abord une solution renfermant 4 ml de brome et 12,5 g de bromure de potassium dans 100 ml d'eau. Cette solution se conserve au réfrigérateur, 2 mois; il faut l'agiter avant l'emploi. On prépare alors extemporanément :
 - = une solution d'hypobromite : avec 4 ml NaOH (2,5 N) dans 40 ml H₂O + 2 ml de la solution bromée, et on complète à 50 ml avec H₂O.
 - = une solution de nitrite : avec 10 ml NaNO₂ à 0,1 % et 10 ml HCl (2,4 N)
 - = une solution copulante : avec 10 ml de sulfamate d'ammonium à 0,5 % dans l'éthanol, et 10 ml de dichlorhydrate de N-naphtyl-éthylène diamine à 0,1 % dans l'éthanol.
- ., Le protocole de la réaction est le suivant : on pulvérise l'hypobromite, à l'abri de la lumière, et on laisse reposer 15 minutes. Puis on chauffe 5 minutes à l'étuve à 100° C. On pulvérise ensuite la solution de nitrite, et après 1 minute le réactif copulant. Ces deux derniers réactifs doivent être pulvérisés assez légèrement.
- Réaction de HUEBNER (1951) : Le papier portant les spots à identifier est suspendu pendant 15 minutes dans une cuve en verre, close, au-dessus de quelques cristaux de bromure de cyanogène. Puis on le pulvérise avec une solution de benzidine à 0,25 % dans l'éthanol à 50 %.

- Réaction de JONES (1949) : C'est une autre réaction au bromure de cyanogène, mais elle a lieu en tube. On fait agir 1 ml de bromure de cyanogène à 4 %, et 5 ml de phthalaté acide de potassium à 2 %, sur 3 ml de solution aqueuse du produit à examiner correspondant environ à 0,5 mg (valable pour les substances à noyau pyridinique). Après 15 minutes de repos, on ajoute 1 ml d'aniline à 4 % dans l'éthanol. La coloration jaune attendue se manifeste après 20 minutes.

 - Réactif de PRUSSMANN (1964, b) à la diphenylamine : C'est un révélateur des nitrosamines. On mélange extemporanément 25 ml de diphenylamine à 1,5 gramme pour 100 ml d'éthanol, avec 5 ml d'une solution renfermant 0,1 g de chlorure de palladium et 0,2 g de NaCl pour 100 ml d'eau. On pulvérise ce mélange, puis on examine le papier sous U.V. de courte longueur d'onde, par exemple à 254 nm.

 - Réactif de PRUSSMANN (1964, a) à la naphtylamine : Le réactif est préparé en mélangeant extemporanément, et à parties égales, une solution d'acide sulfanilique à 1 g/100 ml, et une solution à 0,1 g/100 ml d'alphannaphtylamine, toutes deux dans l'acide acétique dilué à 30 %.
- On expose d'abord le papier comportant les spots à révéler, pendant trois minutes sous U.V. à 254 nm, puis on pulvérise le mélange précédent. Il s'agit également d'un révélateur des nitrosamines.
- Réaction de ROBERTSON (1964) : On pulvérise d'abord, sous un courant d'air chaud, une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à saturation dans le méthanol, puis après un séjour de 20 minutes à l'étuve à 100° C, une solution de chlorure ferrique à 1 % dans l'éthanol.

Les divers résultats obtenus avec les réactifs ci-dessus, sont regroupés dans le tableau suivant :

Réactions	Nicotinamide	N-Oxyde de nicotinamide
Examen sous U.V. à 254 nm à 366 nm	violet foncé mauve, halo blanc	bleu intense bleu, halo clair
Solution éthéropétrolique d'iode à saturation (Pr. CHAMBON)	brun-foncé	brun-clair
Réactif iodoplatitique	jaune, granité de brun au centre	violacé
Réactif ioduro-amidoné en milieu acétique	violet, fond mauve	bleu
Bleu de méthylène à 1°/oo aqueux	vert clair, fond bleu	rose-pâle, fond bleu
Ortho-dianisidine-tétrazotée à 1°/oo aqueux	0	rose léger, fond bleu après 24 heures
Vert de bromocrésol à 2 °/oo alcoolique	gris-vert	gris-bleuté, devenant jaune en 24 h.
Réaction de BICKEL	jaune-foncé	très léger jaune-pâle
Réaction de DANILOVIC	très légèrement rosé devenant jaune	0
Réactif de DRAGENDORFF modifié	rouge-orangé, centre granité décoloré, sur fond orange	jaune à orangé-clair suivant concentration
Réaction de GUVEN	bleu-vert	0
Réaction de HOLMAN	rouge	rose-mauve
Réaction de HUEBNER	rose-saumon à rouge	0
Réaction de JONES	jaune-vif	0
Réaction de PRUSSMANN (diphénylamine)	avant U.V. = 0 à 254 nm = violet à 366 nm = fluorescent	avant U.V. = 0 à 254 nm = violet à 366 nm = fluorescent
Réaction de PRUSSMANN (naphtylamine)	spot jaune décoloré sur fond rose, en 24 h.	spot rose plus soutenu que le fond, en 24 h.
Réaction de ROBERTSON	brun-rougeâtre	0

De l'ensemble des réactions décrites, se dégage l'intérêt de l'examen sous lumière ultra-violette, qui permet de repérer instantanément tout en les différenciant, des spots de nicotinamide ou de N-Oxyde, particulièrement sur des chromatogrammes, après développement avec un solvant approprié. Nous avons eu recours à ce procédé systématique lors de nos essais chez l'animal.

La solution éthéropétrolique d'iode est très sensible, et possède l'avantage de s'éliminer assez facilement, par volatilisation, permettant l'usage ultérieur d'un autre réactif.

Le réactif de PRUSSMANN à la naphtylamine pourrait être intéressant, mais son action est longue à se manifester, et nécessite par ailleurs des quantités assez importantes de produit pour donner une réaction nette; ceci exclut donc son emploi sur des chromatogrammes d'urine obtenue en cours de métabolisation de la nicotinamide, où l'on peut s'attendre à ne retrouver que des traces de produit.

Le réactif de HOLMAN, qui applique la seconde méthode d'HOFFMAN, consistant à transformer une amide en amine, puis réalise une diazotation et une copulation avec une amine aromatique, est assez spécifique, mais son utilisation manque de simplicité pour être réalisée en routine.

En définitive, nous avons eu recours principalement, à l'examen sous lumière U.V., à la pulvérisation de réactif de DRAGENDORFF modifié, ou de solution éthéropétrolique d'iode, quand il s'agissait de spots chromatographiques, provenant de fractions d'urine métabolisée.

f) Systèmes chromatographiques utilisés : Nous avons cherché à comparer les Rf de la nicotinamide Codex, avec ceux du N-Oxyde de nicotinamide synthétisé par nos soins, dans divers solvants, utilisant soit le papier, soit des couches minces de gel de silice, comme support. Toutes ont été réalisées selon la technique de chromatographie ascendante, qui donne de meilleurs résultats. D'une façon générale, et sans qu'il en soit fait mention ultérieurement, les Rf indiqués dans le tableau suivant, correspondent

aussi bien aux Rf trouvés pour les produits purs isolés, que pour le mélange des deux, ce qui permet de voir aussitôt les solvants qui seront applicables à une séparation de la nicotinamide et de son N-Oxyde.

1. Chromatographies sur papier Whatman N° 1

Solvant	Papier	Migration Temps Hauteur	Nicotinamide	Nicotinamide N-Oxyde
Butanol saturé d'eau	simple	6 h.30 (179 mm)	Rf: 0,63	Rf: 0,24
	phosphaté	1 h.30 (100 mm)	0,60-0,65	0,21-0,24
Butanol saturé d'eau-acide acétique (60:1)	simple	2 h.30 (113 mm)	0,66	0,25
	phosphaté	1 h.30 (97 mm)	0,56	0,22
Butanol-acide acétique-eau (4:1:5)	simple	4 h. (138 mm)	0,74	0,48
Butanol-acide acétique-eau (100:14:38)	simple	4 h. (147 mm)	0,69	0,41
Butanol-acide formique-eau (77:10:13)	simple	1 h. (103 mm)	0,44	0,21
	phosphaté	3 h. (154 mm)	0,49	0,25
Butanol saturé d'eau-acide formique (30:7)	simple	2 h.30 (160 mm)	0,51	0,30
Alcool amylique-acide acétique-eau (6:3:3)	simple	1 h.30 (75 mm)	0,72	0,53
Alcool isopropylique-sulfate d'ammonium à 1 % (2:1)	simple	4 h. (120 mm)	0,86	0,67
	sulfaté	3 h. (104 mm)	0,84	0,65
Butanol saturé d'ammoniaque(N)	simple	3 h.30 (128 mm)	0,69	0,29
Propanol-eau (8:2)	simple	1 h.15 (79 mm)	0,76	0,48
Propanol-eau (6:4)	simple	1 h.30 (91 mm)	0,81	0,61
Alcool à 95°-ammoniaque (95:5)	simple	7 h.45 (245 mm)	0,61	0,23
Méthanol-chloroforme (5:15)	simple	4 h. (177 mm)	0,94	0,41
Acétone-eau (7:3)	simple	1 h.15 (112 mm)	0,86	0,70

Ces différents essais nous apportent outre des solvants nouveaux, la confirmation des travaux antérieurs des auteurs qui ont travaillé sur le N-Oxyde de nicotinamide :

= le butanol saturé d'eau (BONAVITA 1961) donnait des Rf de 0,60 et

0,23, tandis que nous trouvons des Rf de 0,63 et 0,24 pour la nicotinamide et pour son N-Oxyde, respectivement.

- = le mélange butanol-acide acétique-eau (4:1:1) de MURRAY(1966), donnait des Rf de 0,70 et 0,45, tandis qu'avec des proportions un peu différentes (4:1:5) nous trouvons des Rf de 0,74 et 0,48.
- = le mélange acétone-eau (7:3) de CHAYKIN (1959), donnait des Rf de 0,87 et 0,69 que nous avons trouvés personnellement à 0,86 et 0,70.
- = le mélange butanol saturé d'eau-acide acétique (60:2) de CHAYKIN (1959), donnait des Rf de 0,70 et 0,32; avec une légère modification des proportions (60:1) nous avons obtenu une bonne séparation à 0,66 et 0,22.

Ce dernier système solvant nous a paru être le plus intéressant car il assure une bonne séparation de la nicotinamide et de son N-Oxyde, en un temps relativement bref (2 h.30 à 3 h.). Pour un travail plus rapide on peut avoir recours au mélange butanol-acide formique-eau (77:10:13), qui migre d'environ 10 cm en une heure, mais donne des Rf moins nettement différenciés.

2. Chromatographies sur couches minces : Nous avons utilisé des couches minces de gel de silice, soit sur film plastique, soit sur verre.

Dans le premier cas, il s'agit des films KODAK K 301 V, qui sont recouverts d'un gel de silice très fin, avec un liant à base d'alcools polyvinyliques.

Dans le second cas, ce sont des plaques de verre mince, livrées prêtes à l'emploi par la firme MERCK, sous la référence "Kieselgel F 254", et qui sont enduites d'un gel de silice auquel on a incorporé un indicateur fluorescent à 254 nm. La nature du liant n'est pas précisée par la firme.

En outre, nous avons pu réaliser un essai sur plaque de verre MERCK recouverte de cellulose. Comme nous le verrons pas la suite, l'utilisation de ce type de plaque se rapproche de la chromatographie sur papier, mais en donnant des Rf un peu plus faibles.

Les résultats de nos essais sont groupés sous forme de tableau :

Solvant	Support	Migration		Nicotinamide	N-Oxyde de Nicotinamide
		Temps	Hauteur		
Isopropanol-ammoniaque(N)- eau (20:1:2)	silice KODAK	50 mn	(37 mm)	Rf: 0,54	Rf: 0,30
	silice MERCK	50 mn	(56 mm)	0,66	0,46
Méthanol-ammoniaque concen- trée (99:1)	silice KODAK	50 mn	(82 mm)	0,57	0,30
	silice MERCK	30 mn	(83 mm)	0,71	0,62
Propanol-ammoniaque (N) (95:5)	silice KODAK	50 mn	(38 mm)	0,47	0,23
	silice MERCK	50 mn	(59 mm)	0,63	0,30
Chloroforme-méthanol (15:5)	silice KODAK	25 mn	(70 mm)	0,43	0,23
Butanol saturé d'ammoniaque à 3 %	silice KODAK	2 h.25	(80 mm)	0,43	0,17
Chloroforme saturé d'ammoniaque-méthanol (97:3)	silice KODAK	50 mn	(80 mm)	0,23	< 0,10
Butanol saturé d'eau- acide acétique (60:1)	cellulose MERCK	1 h.10	(65 mm)	0,58	0,21

En conclusion, nous voyons que les meilleures discriminations sont obtenues sur plaques de silice MERCK, avec le solvant à base de propanol et d'ammoniaque, et également avec le solvant renfermant de l'isopropanol et de l'ammoniaque. Sur les films de silice KODAK, les trois premiers solvants donnent des trainées; le mélange de chloroforme et de méthanol semble meilleur, et de plus migre très rapidement.

g) Stabilité de la nicotinamide vis-à-vis de divers agents oxydants :

Nous avons entrepris quelques essais afin d'avoir une idée de la facilité ou de la difficulté avec laquelle la nicotinamide est susceptible de se transformer en N-Oxyde, soit in-vivo, soit in-vitro lorsqu'on cherche à l'extraire des milieux biologiques.

Pour répondre à ce dernier critère, nous avons essayé l'action de l'éther éthylique ordinaire - donc naturellement peroxydé-, en milieu acide, neutre, ou alcalin, qui s'est déjà révélée très apte à transformer certains alcaloïdes au cours de leur extraction par la classique méthode de STASS-OTTO-OGIER (Pr. CHAMBON 1957).

Nous avons préparé les mélanges suivants :

	Mélange N° 1	Mélange N° 2	Mélange N° 3
Nicotinamide	100 mg	100 mg	100 mg
Eau distillée	9 ml	9 ml	9 ml
Acide acétique	1 ml		
Solution saturée $\text{Na}_2 \text{CO}_3$		1 ml	
Ether éthylique ordinaire	10 ml	10 ml	10 ml

Ces trois mélanges sont laissés à l'air libre, puis chromatographiés sur papier, en utilisant des prélèvements de 20 μl (représentant 100 μg de nicotinamide), réalisés après 1 jour, 2, 3, 4 et 5 jours, respectivement. Les divers systèmes chromatographiques à base de butanol, précédemment cités, et utilisés sur papier Whatman simple ou phosphaté, ont tous conduit au même résultat : l'essai traité par l'éther, migre avec le même Rf que le témoin de nicotinamide, quel que soit le pH.

Nous voyons donc qu'il n'y a aucun effet oxydant à redouter de l'éther si on l'utilise pour extraire la nicotinamide à partir des milieux biologiques.

Nous avons également entrepris une étude comparée, de l'action oxydante des persels (perborate et persulfate de sodium à 10 % en solution aqueuse), et de l'eau oxygénée diluée (en milieu acide ou alcalin). Celle-ci nous a révélé les faits suivants, en s'appuyant sur l'analyse chromatographique des 4 mélanges ci-après :

	Mélange N° 1	Mélange N° 2	Mélange N° 3	Mélange N° 4
Nicotinamide.....	100 mg.....	100 mg.....	100 mg.....	100 mg
Eau distillée.....	7 ml.....	7 ml.....	7 ml.....	7 ml
Acide acétique	1 ml.....	1 ml.....	1 ml.....	
Solution saturée Na ₂ CO ₃				1 ml
Eau oxygénée à 10 volumes			1 ml.....	1 ml
Perborate de sodium à 10 %	2 ml.....			
Persulfate de sodium à 10 %		2 ml		

Dès le premier jour de contact, nous avons pu constater que le perborate, ainsi que l'eau oxygénée en milieu acide, transformaient partiellement la nicotinamide en N-Oxyde.

Après 5 jours de réaction, à température ordinaire, l'eau oxygénée en milieu acide et le perborate ont oxydé respectivement, environ 2/3 et 1/2 de la nicotinamide. Le persulfate, pendant le même temps, a oxydé environ le 1/3, et l'eau oxygénée en milieu alcalin n'a réussi à former que des produits différents, dont les Rf sont intermédiaires entre ceux de la nicotinamide et de son N-Oxyde.

L'agent oxydant qui s'est révélé le plus efficace, parmi ceux essayés, est sans aucun doute l'eau oxygénée (même diluée) en milieu acide, ce qui nous confirme le bien-fondé de la méthode de synthèse adoptée, et d'autre part nous laisse envisager la possibilité d'une oxydation biologique, in-vivo, avec l'eau oxygénée endogène.

h) Réduction du N-Oxyde de nicotinamide :

La caractérisation du N-Oxyde de nicotinamide (synthétisé par nos soins) fut complétée par sa réduction, aboutissant à l'obtention finale de la nicotinamide de départ, révélée par la chromatographie sur papier.

Nous avons eu recours, avec plus ou moins de succès d'ailleurs, à divers agents réducteurs :

- Réduction par l'hydrosulfite de sodium : cette méthode est préconisée par KOISUMI (1965), pour réduire le TMAO. Nous l'avons appliquée ici au N-Oxyde de nicotinamide (40 mg), qui a été soumis à l'ébullition à reflux en présence d'une solution saturée d'hydrosulfite de sodium (1 ml) et d'eau distillée (10 ml), pendant deux heures. Après concentration sous vide et chromatographie sur papier, avec le solvant butanol saturé d'eau-acide acétique (60:1), le N-Oxyde apparaît inchangé.

- Réduction par l'hydrogène catalysé sur Nickel de RANEY : Nous avons commencé par préparer le Nickel de RANEY en faisant subir à l'alliage nickel-aluminium correspondant, des traitements répétés à chaud (90° à 100°C), avec une solution concentrée d'hydroxyde de sodium, suivis de lavages, à froid, par l'eau et l'alcool éthylique absolu, pour le débarrasser de l'aluminium et obtenir du nickel très pur et divisé, que l'on conserve sous alcool, car il est pyrophorique.

Quant à l'hydrogène, nous l'avons purifié par passage sur plombite de sodium, afin de le débarrasser de l'hydrogène sulfuré éventuel.

A partir de là, nous avons essayé plusieurs méthodes. La première utilise l'action de l'hydrogène et du nickel en milieu anhydre, en présence d'éthanol; la seconde en milieu aqueux et alcalin; la troisième en milieu acide et anhydre.

Les mélanges réactionnels suivants ont été soumis à l'hydrogénation à température et à pression ordinaires, avec agitation magnétique simultanée :

	Essai N° 1	Essai N° 2	Essai N° 3
N-Oxyde de nicotinamide	100 mg	100 mg	100 mg
Ammoniaque à 1 %.....	10 ml		
Ethanol		10 ml.....	
Acide acétique/anhydride acétique (10:1).....			5 ml
Nickel de RANEY	0,30 g	0,30 g	0,30 g

- Dans le 2e essai, le nickel est rincé à l'éthanol.
- Dans le dernier essai, le nickel est lavé par le méthanol puis par l'anhydride acétique, plusieurs fois avant usage.

Après 30 minutes, on constate que la consommation d'hydrogène est nulle. On prolonge encore 30 mn, puis on arrête la réaction.

En ce qui concerne le premier essai, en milieu alcalin, on le divise en deux parties, dont l'une est neutralisée par addition d'acide acétique diluée; les deux fractions sont appelées 1a et 1b.

Toutes les solutions obtenues (1a, 1b, 2 et 3) sont centrifugées pour éliminer le nickel, puis concentrées avant d'être chromatographiées sur papier Whatman N° 1, avec le solvant butanol-acide formique-eau (77:10:13). La révélation des spots, par examen sous rayonnement ultra-violet, puis par pulvérisation du réactif de DRAGENDORFF modifié par BILINSKI (1964), donne les résultats suivants (figure 1) : il apparaît que, dans le meilleur des essais (N° 3), c'est-à-dire en milieu acétique/anhydride acétique, la réduction n'est que partielle. Tous ces essais donnent un spot gris sur la ligne de départ, correspondant sans doute à une combinaison avec le nickel. En milieu alcalin (N° 1a), il s'est peut-être formé un sel d'ammonium, qui se serait transformé en acide nicotinique par addition d'acide acétique (N° 1b).

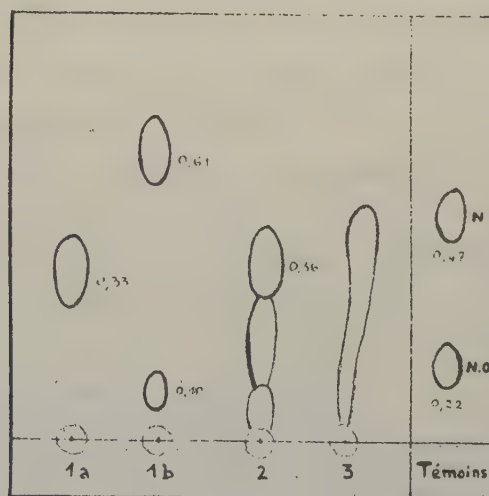


Figure 1

- Réduction par l'acide oxalique : Nous avons fait agir un léger excès d'acide oxalique (150 mg) en solution chlorhydrique diluée (8 ml à 5%), sur du N-Oxyde de nicotinamide (100 mg). Après 12 heures de contact à température ordinaire, le mélange réactionnel est divisé en deux parties : la première (a) est, après 12 heures de contact supplémentaires, neutralisée par l'ammoniaque en quantité juste calculée, avant d'être comme la seconde (b), concentrée à un faible volume et chromatographiée.

La chromatographie est réalisée sur papier Whatman N° 1, avec le solvant : butanol saturé d'eau-acide acétique (60:1), et donne les résultats suivants (figure 2) : il semble que dans le premier essai (a) il se soit formé partiellement un oxalate de nicotinamide, laissant une partie du N-Oxyde inchangé. En prolongeant l'action de l'acide oxalique, puis en neutralisant le milieu, la réduction en nicotinamide est plus nette, quoique partielle, puisqu'on conserve une traînée (visible sous U.V.) entre le spot et le point de départ. Il apparaît, à la suite de ces différentes tentatives sur le N-Oxyde de nicotinamide, que la stabilité des N-Oxydes pyridiniques vis-à-vis de la réduction (OCHIAI 1953) se trouve bien confirmée, car nous n'avons pu, dans tous les cas, obtenir une réduction que partielle.

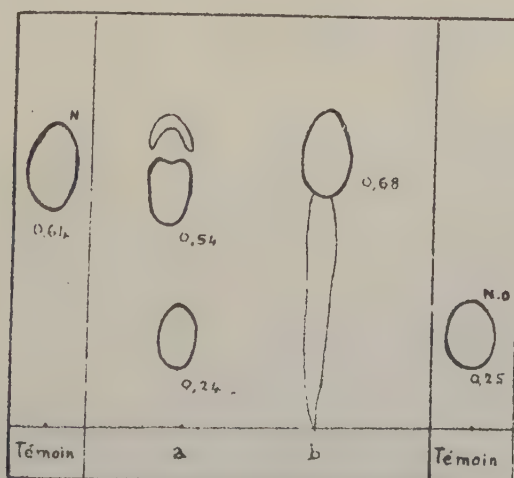


Figure 2

III - METHODES DE DOSAGE

Nous avons vu, au chapitre des travaux antérieurs les diverses méthodes colorimétriques applicables au dosage de la nicotinamide. Néanmoins, afin de doser la nicotinamide et son N-Oxyde dans des conditions identiques, nous avons cherché une méthode de dosage qui leur soit commune et applicable à de très faibles quantités.

L'étude du spectre U.V. de ces deux substances, qui présente dans les deux cas un maximum et un minimum d'absorption très nets, nous a suggéré de mettre en pratique la technique de dosage utilisée par BOLT et FORREST (1967) pour les métabolites de la chlorpromazine. Cette méthode, dite de "Background cancellation", consiste à mesurer la densité optique corrigée, ou Δ D.O., au maximum d'absorption. Ceci permet de se débarrasser de l'interférence des impuretés, constituant le fond (ou "background") de la courbe spectrale. En pratique, on mène une tangente à la courbe, passant par les deux minima situés de part et d'autre du maximum d'absorption. Celle-ci constitue la ligne de base à partir de laquelle on mesurera la hauteur du pic Δ D.O., exprimée en unités de densité optique.

L'application de cette méthode conduit à mesurer les Δ D.O. aux longueurs d'onde suivantes (cf. figure 3) :

- 237, 259, 285 nm pour le N-Oxyde de nicotinamide
- 244, 262, 280 nm pour la nicotinamide.

METHODE DE CALCUL DE Δ D.O.

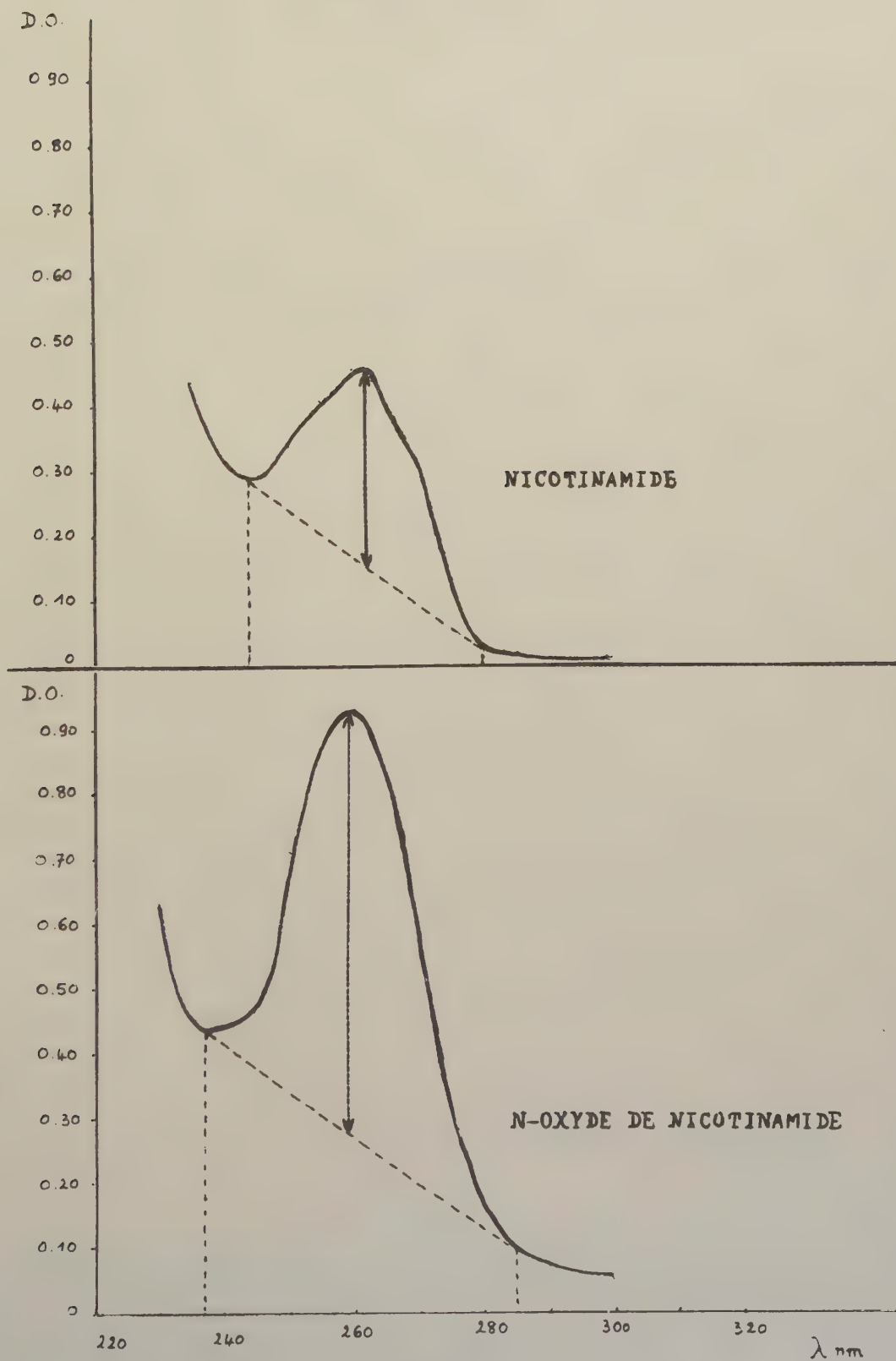


Figure 3

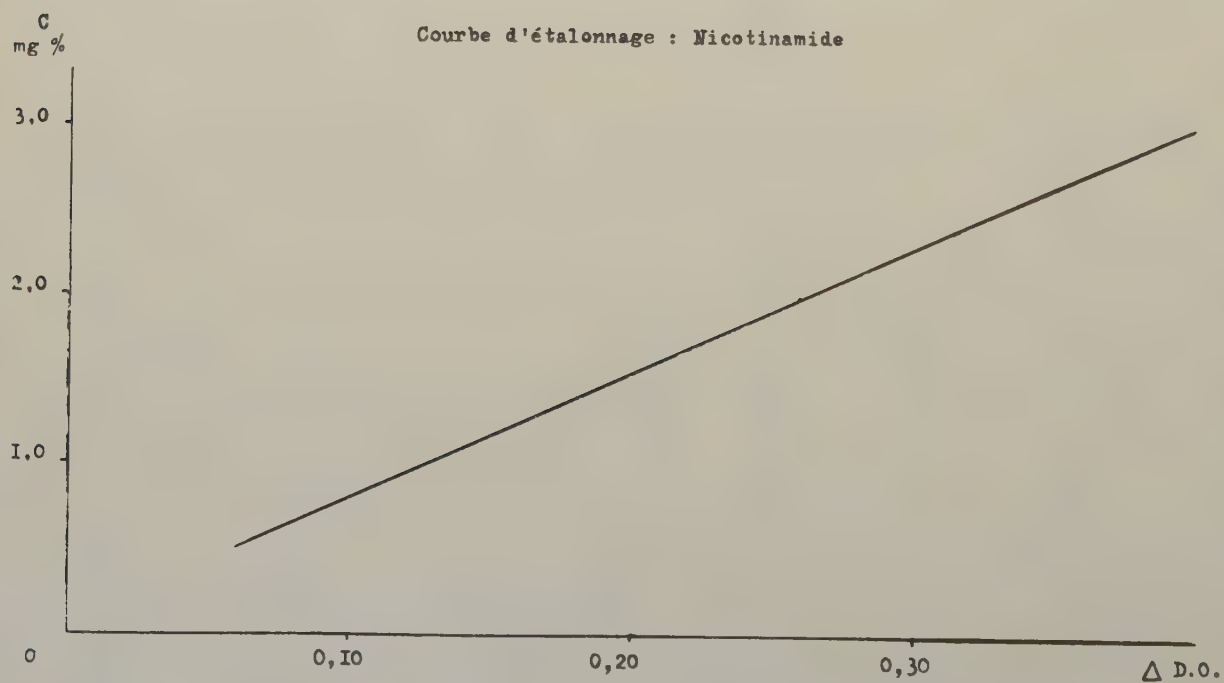
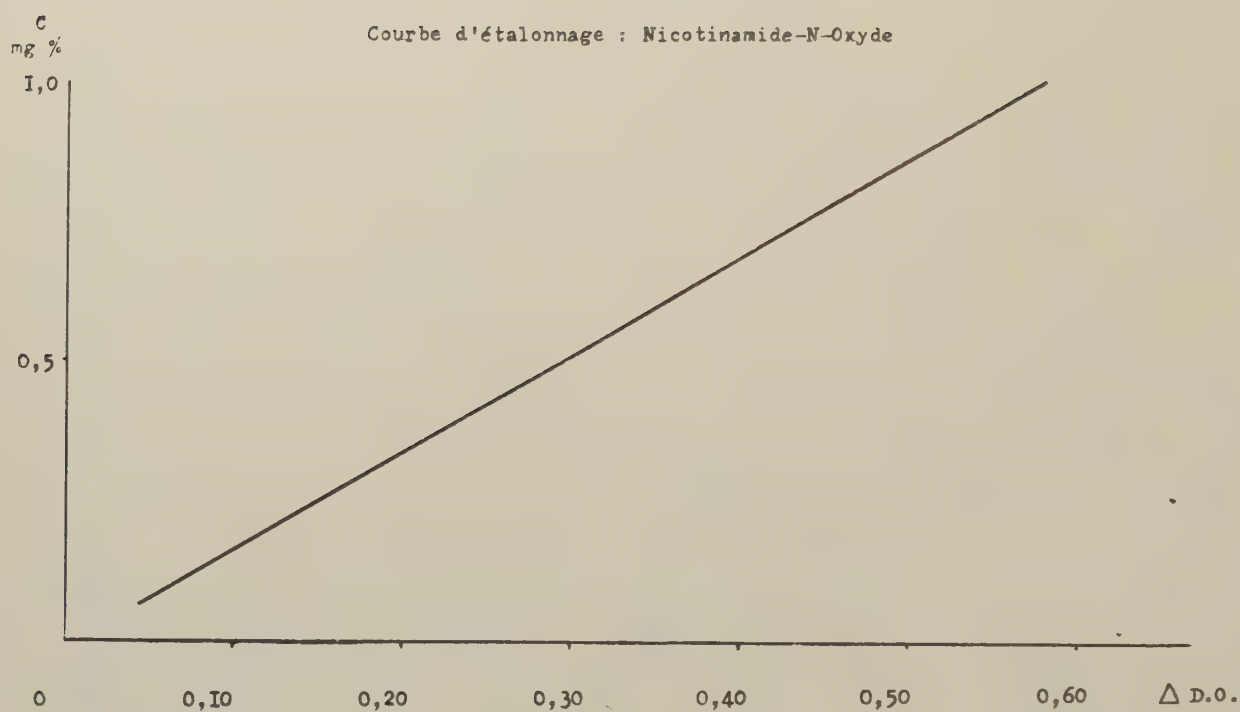


Figure 4

C'est ce que nous avons réalisé successivement sur deux gammes de dilution, l'une pour la nicotinamide entre 0,4 et 3 mg/100 ml d'eau distillée; et l'autre pour le N-Oxyde de nicotinamide entre 0,2 et 1 mg pour 100 ml d'eau. Les courbes représentatives de la concentration en fonction de Δ .D.O. sont deux droites passant par l'origine. Elles sont représentées ici (figure 4), et nous ont permis ultérieurement de doser la nicotinamide et son N-Oxyde dans les éluats de chromatographies urinaires :

NICOTINAMIDE	
Δ D.O.	Concentration en mg / 100 ml d'eau
0,050	0,4
0,100	0,8
0,155	1,2
0,215	1,6
0,265	2
0,410	3

N-OXYDE DE NICOTINAMIDE	
Δ D.O.	Concentration en mg / 100 ml d'eau
0,090	0,2
0,230	0,4
0,350	0,6
0,500	0,8
0,580	1

IV - ESSAIS CHEZ L'ANIMAL

Le précédent travail analytique, nous a permis de disposer de N-Oxyde de nicotinamide, et de mettre au point des méthodes de séparation, de différenciation et de dosage, nous amenant ainsi à pouvoir le rechercher en milieu biologique, après administration de nicotinamide chez l'animal.

En fonction des données de la littérature (SPECTOR 1956), nous avons adapté les doses suivantes à des cobayes mâles communs, pesant entre 400 et 500 grammes : selon les cas, 100 à 150 mg de nicotinamide sont donnés en une seule prise orale. L'administration est réalisée à l'aide d'une seringue de 10 ml terminée par une tubulure souple en polyéthylène de 2 mm de diamètre, que l'on introduit dans l'arrière-gorge de l'animal.

Les cobayes sont placés dans des cages à métabolisme individuelles (fournisseur Ets. LEUNE à Lyon), où l'urine se trouve filtrée au fur et à mesure de son émission, et recueillie dans un béccher entouré de glace. Nous basant sur les travaux antérieurs de CHAYKIN (1965), nous avons décidé de recueillir ces urines pendant les 24 heures suivant l'administration de la nicotinamide.

A. Premier essai de métabolisme de la nicotinamide : Afin d'augmenter nos chances de trouver du N-Oxyde de nicotinamide dans les urines de cobaye, nous avons procédé à une surcharge assez importante en nicotinamide. Pour cela nous en avons administré 100 mg par jour, pendant trois jours consécutifs, et recueilli la totalité des urines émises, soit 190 ml.

Ces urines furent évaporées à sec, sous pression réduite (15 mm Hg), à 60° C, dans l'évaporateur rotatif, précédemment décrit au chapitre des travaux personnels sur le TMAO.

Le résidu sec, repris par 35 ml d'eau distillée, fut ensuite centrifugé afin d'éliminer les particules insolubles restées en suspension. La liqueur brune surnageante fut alors soumise à divers procédés de purification, afin de sélectionner le meilleur. En effet, une première tentative de

chromatographie sur papier, réalisée sur l'urine précédente reconcentrée, avec le solvant à base de butanol saturé d'eau, et acide acétique (60:1), n'avait donné qu'une longue traînée, fluorescente à 254 nm, sans aucun spot distinct.

Aussi avons-nous essayé plusieurs techniques, telles que le passage sur colonne de cellulose, la filtration sur charbon actif, la méthode de STASS-OTTO classique, et enfin le traitement de l'urine par l'uréase.

a) Passage sur colonne de cellulose : Nous espérons ainsi obtenir un extractif urinaire limpide, et non coloré. Or, après passage d'un mélange d'urine de cobaye témoin (5 ml) avec de la nicotinamidé (50 mg) ou avec du N-Oxyde de nicotinamide (50 mg), sur une colonne de cellulose de 30 cm de haut sur 1 cm d'ouverture, et élution par l'eau distillée, en fractionnant l'éluat en 9 parties successives de 3 ml, nous avons constaté que c'était la sixième fraction, la plus colorée, qui renfermait le maximum de principe actif. Par ailleurs, toutes les autres fractions en renfermaient, en quantités variables. La mise en évidence du principe actif (nicotinamide ou son N-Oxyde) est réalisée en faisant des "spots-tests" de 5 µl, pour chaque fraction, et en les révélant tout d'abord sous rayonnement ultra-violet, puis par pulvérisation de réactif de DRAGENDORFF modifié (BILINSKI 1964). On compare alors les intensités obtenues.

Un essai analogue fut tenté en imprégnant la cellulose avec le solvant renfermant du butanol saturé d'eau et de l'acide acétique (60:1), que nous appellerons désormais "601" en abrégé, pour plus de commodité. L'élution est réalisée avec ce même solvant, et conduit à l'obtention de 5 fractions égales : ici encore c'est la 5ème fraction, la plus colorée, qui renferme le maximum de principe actif, mais toutes les autres en renferment aussi. Cette méthode de purification ne se révèle donc pas satisfaisante.

b) Filtration sur charbon végétal activé : nous nous sommes alors orienté vers la sélection des principes actifs par passage sur charbon végétal activé Prolabo, en poudre. Un mélange d'urine témoin, chargée en

nicotinamide et en N-Oxyde, est filtré sur un entonnoir garni de coton et d'une couche de charbon, de 1 cm d'épaisseur sur 0,5 cm de diamètre. La filtration est très lente, mais conduit à l'obtention d'une liqueur limpide, pratiquement incolore. Celle-ci est chromatographiée sur papier, et ne laisse apparaître ni l'un ni l'autre des spots attendus.

Une expérience analogue fut réalisée en mélangeant de la nicotinamide et son N-Oxyde, en solution aqueuse, avec du charbon végétal activé, et en chauffant pendant 30 minutes à ébullition, avec agitation magnétique. Le mélange, soumis à une séparation chromatographique, donna les mêmes résultats. Donc, dans tous les cas, le charbon actif fixe à la fois les pigments urinaires et les principes actifs, ce qui exclut son utilisation dans la purification des extractifs d'urine.

c) Méthode de STAS-OTTO : Devant ces insuccès, nous avons pensé qu'il serait peut-être souhaitable d'appliquer à ces urines la méthode de STAS-OTTO, classiquement utilisée en toxicologie.

Pour cela, nous avons commencé par réaliser un mélange témoin contenant de la nicotinamide (30 mg) et du N-Oxyde de nicotinamide (20 mg) en solution dans l'eau (20 ml), acidifiée à pH = 3 par une solution d'acide tartrique à 20 %.

Des extractions successives et répétées ont été réalisées par l'éther de pétrole, puis par l'éther (conduisant à un extractif nommé "éther acide"); puis après alcalinisation avec une solution de bicarbonate de sodium et extraction par l'éther éthylique à pH = 9 (donnant l'"éther alcalin"), puis par le chloroforme (donnant le "chloroforme alcalin").

Les diverses phases ont été filtrées sur papier sec, puis concentrées à un faible volume, et enfin chromatographiées sur papier avec le solvant "601". Des essais réalisés, il ressort, après examen des chromatogrammes sous lumière U.V. et pulvérisation de réactif de DRAGENDORFF modifié, que :

- = l'éther de pétrole ne renferme aucun des principes actifs.
- = l'éther acide donne un léger spot de N-Oxyde de nicotinamide.
- = l'éther alcalin donne un très petit spot de N-Oxyde et un petit spot de nicotinamide, dont le Rf est un peu inférieur, car il a traîné.
- = le chloroforme alcalin donne une traînée orange, depuis le niveau du N-Oxyde jusqu'à celui de la nicotinamide.
- = quant à la phase aqueuse restante, après ces extractions, elle renferme encore un peu de N-Oxyde de nicotinamide et de la nicotinamide.

Ces résultats nous amènent à conclure que la méthode de STAS - OTTO, dans sa deuxième partie au moins, telle que nous venons de la réaliser, est inapplicable à une solution aqueuse renfermant de la nicotinamide et son N-Oxyde, comme ce pourrait être le cas avec un extractif urinaire provenant du métabolisme de la nicotinamide.

Aussi avons-nous essayé d'appliquer directement à l'urine, la première partie de la méthode de STAS - OTTO, qui consiste en une purification par l'alcool éthylique de titre croissant, visant à éliminer les substances insolubles dans l'alcool fort (substances protéiques notamment), pour ne garder que les principes actifs solubles.

L'extractif urinaire, centrifugé précédemment, est d'abord concentré jusqu'à consistance sirupeuse dans un évaporateur rotatif, à 60° C, sous pression réduite.

Le résidu est aussitôt traité par 20 ml d'alcool à 95°, chaud, et agité pendant quelques minutes par rotation de l'appareil, puis la liqueur est filtrée sur papier. Celle-ci renferme donc la nicotinamide et son N-Oxyde, éventuellement présents dans l'urine. Le ballon est rincé par de l'eau distillée, et on met de côté cette solution aqueuse.

La liqueur alcoolique jaune-pâle obtenue, est à nouveau concentrée sous vide, puis reprise par 20 ml d'éthanol pur et chaud, et enfin filtrée.

Le ballon est à nouveau rincé par de l'eau distillée, et l'on conserve les eaux de rinçage, afin d'être sûr de ne rien perdre.

La nouvelle solution alcoolique est à nouveau concentrée, pratiquement à sec, reprise par 10 ml d'eau distillée, puis délipidée par agitation avec de l'éther de pétrole. On obtient finalement un "extractif alcoolique" que l'on concentre à un faible volume : il se présente sous l'aspect d'une solution sirupeuse jaune-pâle.

Toutes les eaux de rinçage regroupées, ainsi que les résidus restés sur les filtres, sont réunis pour former la solution aqueuse dite des "résidus hydro-solubles", que l'on conserve afin de vérifier si elle ne contient pas de produits actifs intéressant, et dont il sera question ultérieurement.

L'extractif alcoolique est alors soumis à une chromatographie sur papier, avec le solvant "601", en s'entourant des deux témoins : nicotinamide et son N-Oxyde. Les résultats obtenus sont les suivants (figure 5) :

- nicotinamide témoin : $R_f = 0,67$

- N-Oxyde de nicotinamide témoin :
 $R_f = 0,245$

- extractif alcoolique : un spot $R_f = 0,65$, violet sous U.V. à 254 nm comme le témoin nicotinamide, et se colorant également en orangé avec le réactif de DRAGENDORFF modifié. Ce spot est entouré de deux zones claires, visibles sous U.V., et précédé d'un autre spot $R_f = 0,28$ qui apparaît rosé dans les mêmes conditions, et décolore légèrement le réactif de DRAGENDORFF, ce qui se traduit par une tache jaune-claire sur un fond jaune plus foncé.

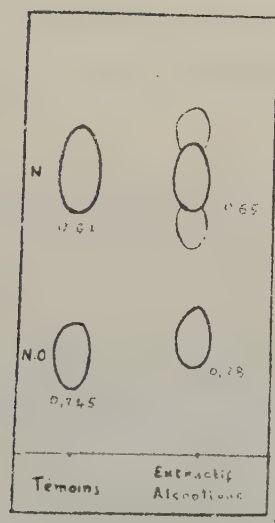


Figure 5

L'intérêt de la purification par l'alcool se manifeste très nettement, puisque l'on obtient ainsi plusieurs spots bien différenciés, alors qu'avec l'urine simplement concentrée on n'obtenait qu'une traînée indistincte, fluorescente en lumière ultra-violette.

Le premier spot $R_f = 0,65$ correspond manifestement à de la nicotinamide, le deuxième est plus difficile à interpréter. Nous avons pensé qu'il pourrait peut-être s'agir d'urée. C'est pourquoi nous avons cherché à savoir quel était son R_f , et comment ce composé se comportait vis-à-vis du réactif de DRAGENDORFF. Une nouvelle chromatographie sur papier avec le même solvant, nous a confirmé dans notre hypothèse, nous suggérant alors l'utilisation de l'uréase pour purifier les urines concentrées ou l'extractif alcoolique.

d) Essais à l'uréase : Le premier fut réalisé sur de l'urine de cobaye témoin concentrée (10 ml), chargée en nicotinamide (20 mg) et en N-Oxyde de nicotinamide (20 mg), à laquelle on ajoute la suspension aqueuse d'uréase à 1 % (1 ml) en tampon phosphaté pH = 6,8 (2 ml). Le tout est placé dans une fiole d'erlenmeyer, et agité magnétiquement pendant 30 minutes à 37° C.

On filtre, on centrifuge, et on concentre, avant de chromatographier sur papier avec le solvant "601", suivant la technique bidimensionnelle. Les résultats obtenus sont assez encourageants, puisqu'on obtient ainsi deux spots, dont les R_f 0,235 et 0,59 sont très voisins de ces deux témoins : nicotinamide ($R_f = 0,58$) et son N-Oxyde ($R_f = 0,20$).

Nous avons ensuite opéré de la même façon avec l'extractif alcoolique d'urine, que nous avons soumis à l'action de l'uréase, puis chromatographié dans deux dimensions. On constate que l'urine restante et l'uréase, freinent la migration des principes actifs de l'extractif alcoolique. Néanmoins, on arrive à localiser un spot, dont la coloration bleu-intense sous U.V. à 254 nm, ainsi que le Rf, laissent supposer qu'il s'agit du N-Oxyde de nicotinamide. En effet, après élution par l'eau distillée, et centrifugation (afin d'éliminer les petits débris de papier), le spectre U.V. obtenu (N° 2 ci-contre) présente un maximum d'absorption à 258-261 nm, et un minimum à 237-240 nm (au lieu de 259 et 237 nm pour le témoin N-Oxyde de nicotinamide). Le produit élué n'est pas tout à fait pur, car le spectre U.V. n'est pas rigoureusement identique, mais cependant il s'agit vraisemblablement du N-Oxyde de nicotinamide.

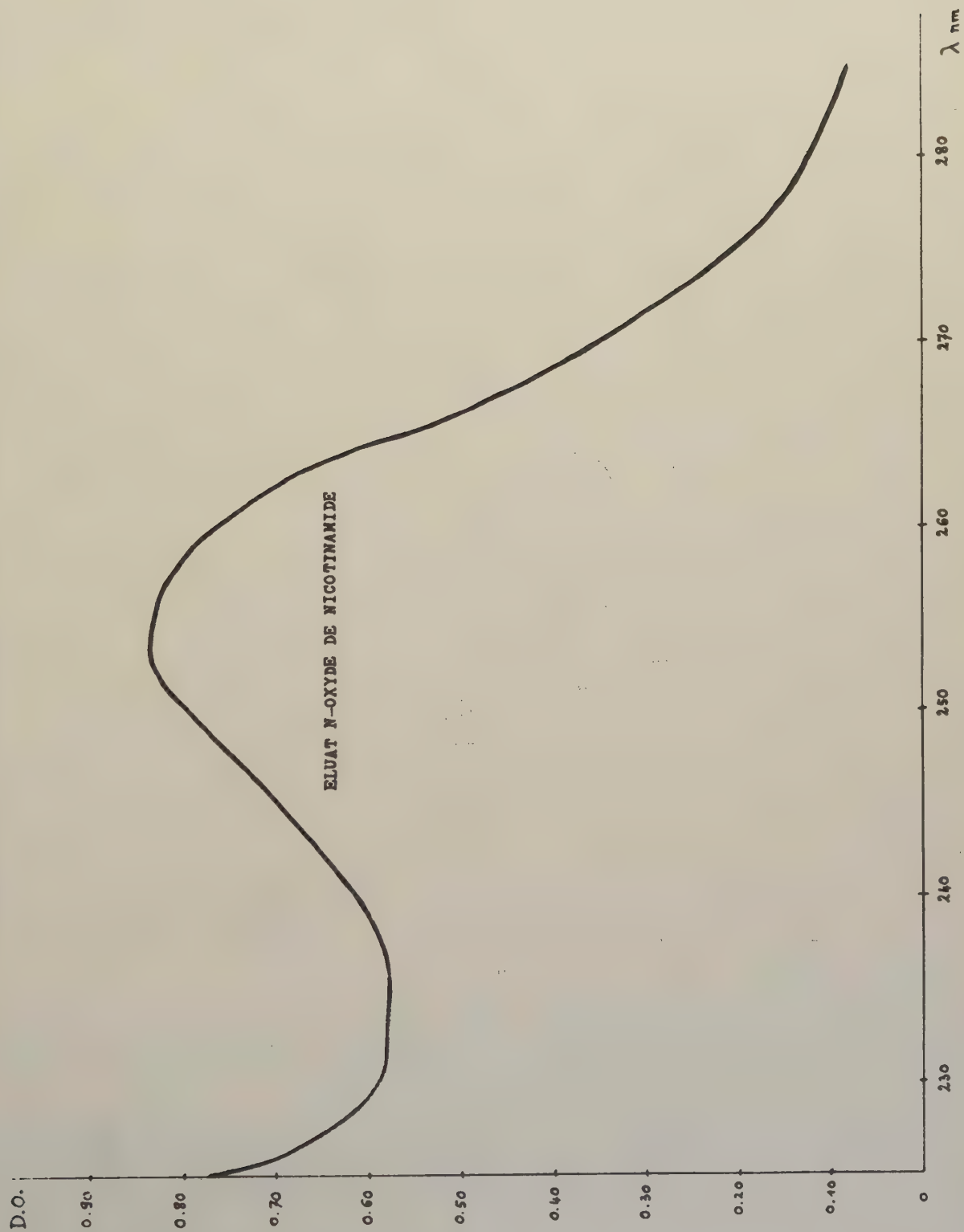
Afin de connaître l'incidence de l'urée sur le spectre de la nicotinamide (leurs Rf étant très voisins dans le système solvant "601"), nous avons mesuré la densité optique d'une solution d'urée à 259 nm :

- en solution aqueuse à 5 mg/100 ml, D.O. = 0,013

- en solution aqueuse à 50 mg/100 ml, D.O. = 0,070

Ces chiffres sont très faibles et ne peuvent guère apporter de modification au spectre U.V. du N-Oxyde de nicotinamide.

1° METABOLISME DE LA NICOTINAMIDE : ESSAI A L'UREASE - SPECTRE U.V. N° 2



Cependant, afin de contrôler si l'uréase risquait d'hydrolyser la fonction amide de la nicotinamide ou de son N-Oxyde, nous avons procédé aux trois essais suivants (figure 6) :

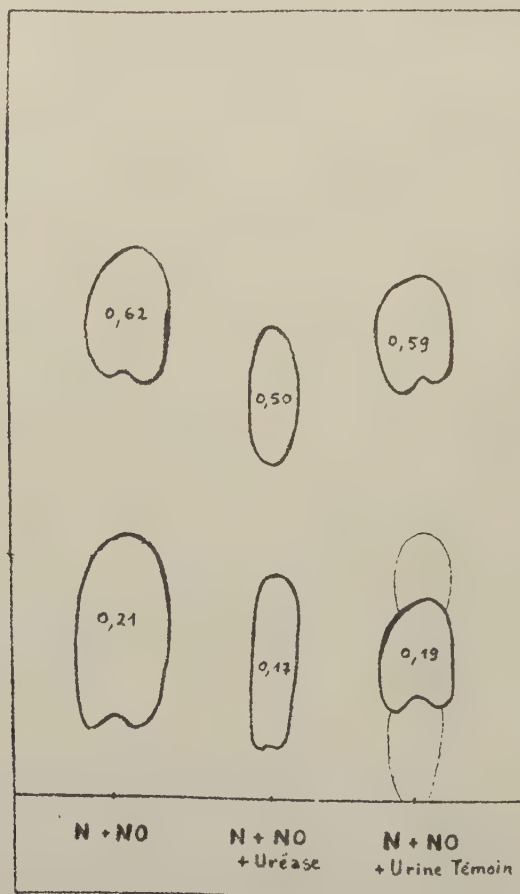


Figure 6

- = urine témoin concentrée ($10 \mu\text{l}$) + nicotinamide ($50 \mu\text{g}$) et son N-Oxyde ($50 \mu\text{g}$) déposés en un seul spot chromatographique sur papier, avec le solvant "601".
- = nicotinamide ($50 \mu\text{g}$) et son N-Oxyde ($50 \mu\text{g}$), déposés de même en un seul point.
- = le même mélange témoin est à son tour traité par l'uréase dans les conditions décrites précédemment, avant d'être chromatographié.

On constate que dans le premier cas, l'urine a freiné la migration ($R_f = 0,59$ et $R_f = 0,19$) et fait diminuer la taille des spots par rapport aux témoins ($R_f = 0,62$ et $R_f = 0,21$). L'uréase freine encore plus la migration ($R_f = 0,50$ et $R_f = 0,17$) et diminue encore la taille des spots, qui, de plus, ont tendance à traîner.

Tout se passe comme si l'uréase hydrolysait partiellement la nicotinamide et son N-Oxyde, ou l'adsorbait, comme cela doit être le cas avec l'urine.

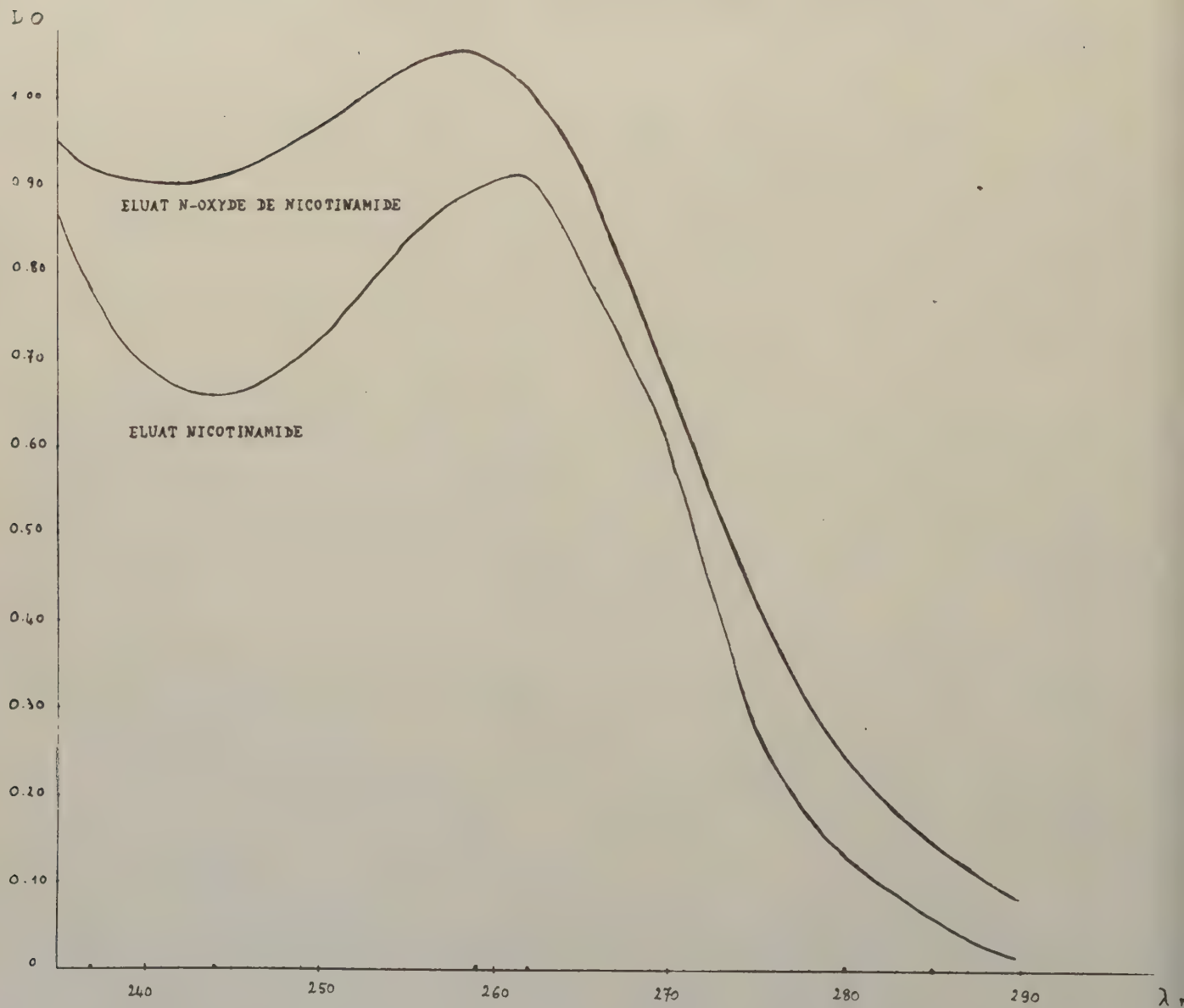
En conclusion, nous voyons que l'emploi de l'uréase n'est pas aussi satisfaisant que l'on pouvait l'espérer a priori. La meilleure méthode de purification de l'urine semble bien être, en définitive, le traitement par l'alcool éthylique de titre croissant, aboutissant à l'obtention d'un "extractif alcoolique", soumis ensuite à la séparation chromatographique bidimensionnelle sur papier avec le solvant "601".

Ce protocole simplifié, évite l'emploi de l'uréase, autant que les extractions multiples par l'éther ou le chloroforme, qui font partie de la classique méthode de STAS et OTTO. Nous pensons que ce procédé peut être généralisable, et c'est pourquoi nous l'avons adopté, à partir de maintenant, pour traiter toutes les urines que nous nous sommes proposé d'étudier.

En ce qui concerne l'urine de cobaye recueillie au cours de ce premier essai de métabolisme de la nicotinamide, la chromatographie suivie d'élution afin d'enregistrer le spectre U.V., nous permet de conclure que l'animal a réellement excrété du N-Oxyde de nicotinamide en quantité appréciable.

Ayant utilisé en totalité ce premier extractif alcoolique d'urine, au cours des chromatographies et autres opérations précédemment décrites, nous avons entrepris une deuxième expérience, en essayant d'améliorer le processus bidimensionnel, par l'emploi successif de deux solvants différents.

2° METABOLISME DE LA NICOTINAMIDE - SPECTRE U.V. N° 3



B - Deuxième essai de métabolisme de la nicotinamide :

Le cobaye choisi, reçut en une seule prise orale, 150 mg de nicotinamide, et ses urines furent recueillies pendant 24 heures, et traitées suivant le processus adopté, pour obtenir finalement un "extractif alcoolique", concentré et assez pur.

De plus, nous avons changé de cuve chromatographique, ce qui nous a permis d'utiliser du papier Whatman de plus grand format (19x21 cm au lieu de 15x19).

Les solvants utilisés étaient le butanol saturé d'eau et acide acétique (60:1), ainsi que le butanol, acide formique, eau (77:10:13). Par ailleurs, nous avons décidé de réaliser toutes nos chromatographies en double exemplaire pour les études de métabolisme, afin de pouvoir en révéler une par la solution éthéropétrolique d'iode puis par le réactif de DRAGENDORFF modifié, et d'éluer l'autre judicieusement après un premier repérage sous lumière U.V.

Nous avons ainsi obtenu des résultats positifs (spectre U.V. N°3):

= pour la nicotinamide :

maximum d'absorption = 261-262 nm (théorique : 262 nm)

minimum d'absorption = 244 nm (théorique : 244 nm)

= pour le N-Oxyde de nicotinamide :

maximum d'absorption = 258-259 nm (théorique : 259 nm)

minimum d'absorption = 240-244 nm (théorique : 237 nm)

Cette deuxième urine renferme donc certainement de la nicotinamide ainsi que son N-Oxyde, comme le prouvent la concordance des Rf dans les deux solvants, la coloration sous lumière ultra-violette, et le spectre U.V., qui est presque théorique dans le cas de la nicotinamide éluee, et un peu moins pur en ce qui concerne le N-Oxyde de nicotinamide. Quant à

l'utilisation de deux solvants différents dans les deux sens de migration, elle ne fait qu'apporter une preuve supplémentaire de l'identité des spots élues, mais en pratique l'utilisation du même solvant "601" est plus commode, et donne une séparation meilleure. C'est pourquoi, par la suite, nous nous sommes borné à l'emploi de ce seul solvant dans les deux dimensions de migration.

Il nous est apparu opportun, à ce moment, d'ajouter un aspect quantitatif aux précédentes déterminations, et également de vérifier la présence éventuelle de conjugués hydrosolubles dans le "résidu aqueux" laissé par l'urine, à côté de "l'extractif alcoolique" précédemment décrit. C'est pourquoi nous avons entrepris une troisième expérience chez le cobaye.

C - Troisième essai de métabolisme de la nicotinamide :

Nous avons administré à nouveau, une seule dose de 150 mg de nicotinamide, par voie orale, au cobaye, et recueilli ses urines pendant 24 heures comme précédemment. Cependant, dans l'optique d'un travail quantitatif, nous avons pris soin de bien mesurer tous les volumes des extraits d'urine. Nous disposons finalement de :

- a) l'extractif alcoolique, évaporé à sec et repris par 2 ml d'éthanol chaud.
- b) la solution aqueuse des résidus hydrosolubles, que l'on divise en deux parties égales :

- b₁) l'une d'elles est simplement évaporée à sec et reprise par 2 ml d'eau distillée.
- b₂) l'autre est d'abord acidifiée par HCl à pH = 1, puis chauffée à 100-110° C au bain de sable, pendant 1 h.30, afin d'hydrolyser d'éventuelles formes conjuguées, puis évaporée à sec et reprise par 2 ml d'eau distillée.

Les travaux réalisés sur ces trois phases ont été les suivants :

a) L'extractif alcoolique fut étudié en chromatographie sur papier avec le solvant "601", qui nous a donné satisfaction auparavant. La technique choisie est soit bidimensionnelle, soit "pointillée". Ce dernier procédé, qui nous est personnel, consiste à déposer l'extractif urinaire sur toute la ligne de départ, sous forme de petits spots rectangulaires, de 10 x 1 mm environ, espacés par des blancs de 2 à 3 mm. Cette technique a l'avantage d'être plus rapide que la première, et de permettre une bonne visualisation des spots dans l'extractif urinaire, car les spots individuels sont assez petits pour ne pas entraver la migration. Par contre elle possède l'inconvénient de donner un produit un peu moins pur à l'élution.

Dans les deux cas, en effet, nous avons élué par l'eau distillée, les zones correspondant à la nicotinamide et à son N-Oxyde, puis déterminé le spectre dans l'ultra-violet (spectres U.V. N° 4, cf. page 132):

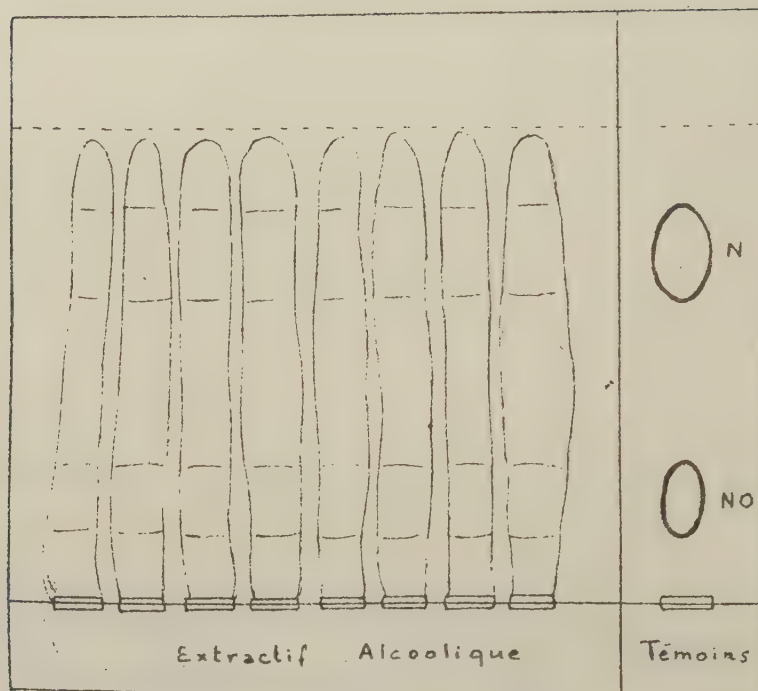


Figure 7

- pour la nicotinamide : un dépôt de 100 μ l, sous forme "pointillée" (figure 7), donne après élution :

= un maximum d'absorption à 262 nm (théorique : 261 nm)

= un minimum à 244 nm (théorique : 244 nm)

= une Δ D.O. = 0,34 ce qui correspond à une concentration finale de 2,58 mg de nicotinamide pour la totalité de l'extractif alcoolique, en se reportant à la courbe d'étalonnage donnée au chapitre des dosages (page 114).

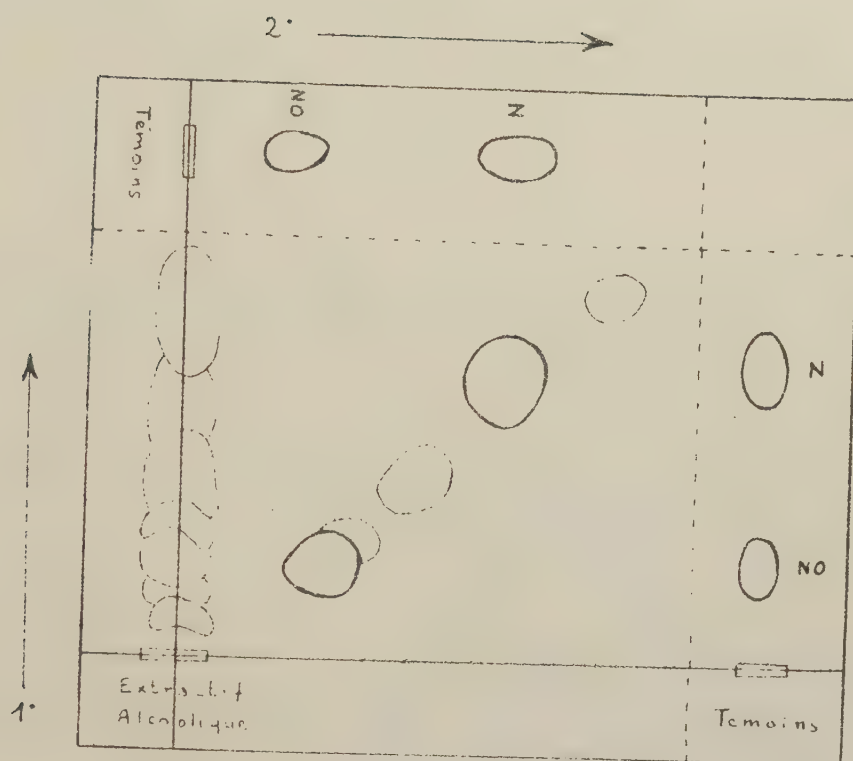


Figure 8

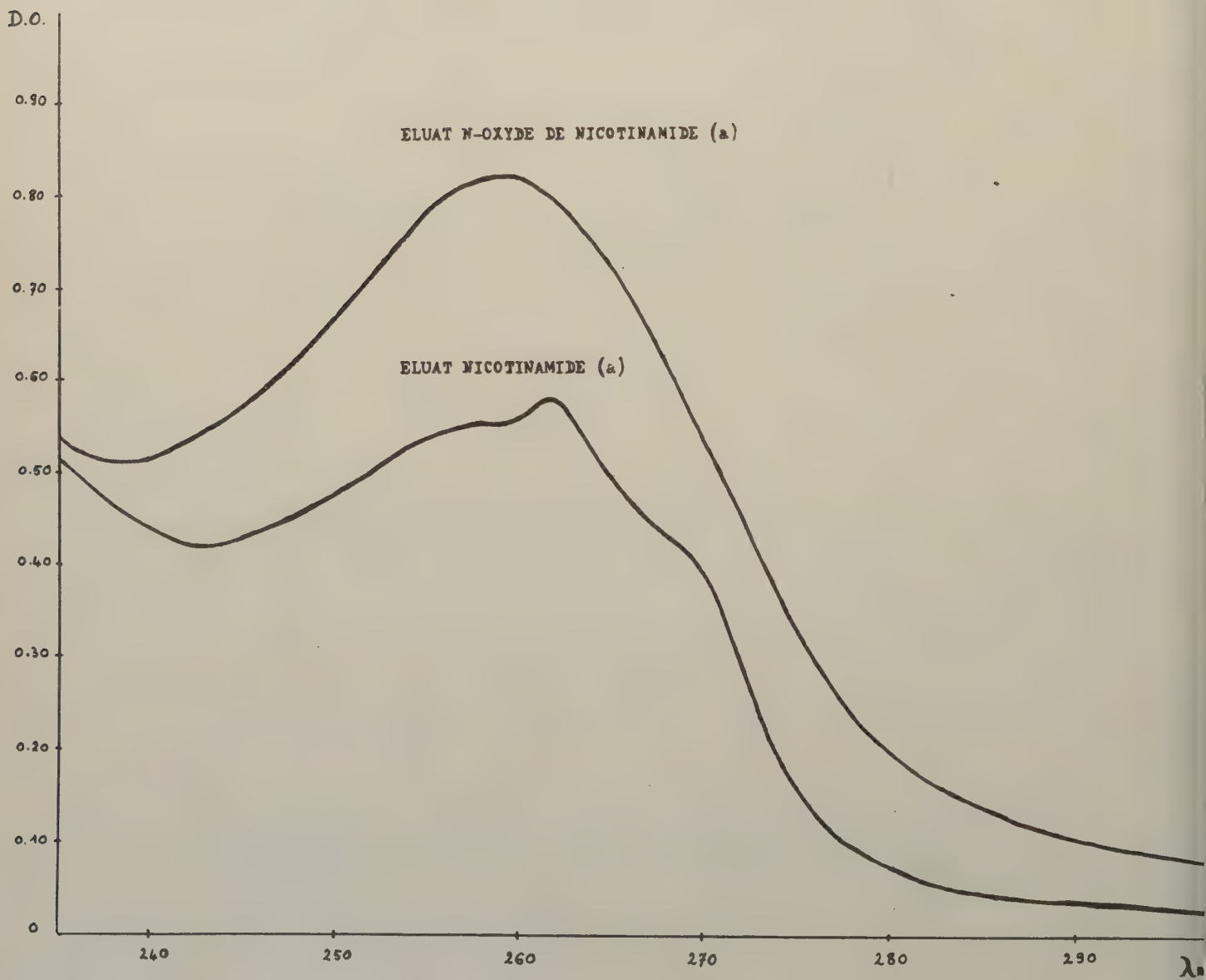
Un autre dépôt, de 150 μ l d'extractif alcoolique, selon la technique bidimensionnelle (figure 8), donne après élution :

= un maximum d'absorption à 262 nm (théorique : 261 nm)

= un minimum à 242-244 nm (théorique : 244 nm)

= une Δ D.O. = 0,32 ce qui correspond à une quantité globale de 1,94 mg de nicotinamide, pour la totalité de l'extractif alcoolique.

3° METABOLISME DE LA NICOTINAMIDE - SPECTRE U.V. N° 4



- pour le N-Oxyde de nicotinamide : un dépôt de 100 μ l d'extractif alcoolique, sous forme "pointillée" (Fig. 7) donne après élution :

- = un maximum d'absorption à 259 nm (théorique : 259 nm)
- = un minimum à 237 nm (théorique : 237 nm)
- = une Δ D.O. = 0,72 ce qui correspond à 0,99 mg de N-Oxyde de nicotinamide pour la totalité de l'extractif alcoolique, en se reportant à la courbe d'étalonnage (page 114).

Un autre dépôt, de 150 μ l d'extractif alcoolique, selon la méthode de chromatographie bidimensionnelle (Fig. 8) donne après élution :

- = un maximum d'absorption à 260 nm (théorique : 259 nm)
- = un minimum à 238-239 nm (théorique : 237 nm)
- = une Δ D.O. = 0,48 ce qui correspond à 0,65 mg de N-Oxyde de nicotinamide, dans la totalité de l'extractif alcoolique.

Les courbes spectrales sont à peu près les mêmes, d'une technique à l'autre, mais néanmoins, comme on pouvait s'y attendre, la technique de dépôt "en pointillé" conduit à des résultats un peu plus élevés, du fait de la moindre pureté de l'éluat et ce, malgré la lecture en densité optique corrigée. Pour bien faire, il faudrait réaliser le "blanc" sur un extractif alcoolique d'urine témoin de cobaye, et non sur de l'eau distillée.

b₁) Le résidu hydrosoluble brut est chromatographié sur papier, en "pointillé", avec le solvant "601". Les courbes spectrales dans l'U.V. (N° 5) après élution comme précédemment, donnent les résultats suivants, pour un dépôt de 400 μ l :

- pour la nicotinamide, le maximum d'absorption est à 260 nm (théorique = 261 nm) et le minimum est à 250 nm (théorique = 244 nm) ce qui donne une Δ D.O. de 0,14 correspondant à une concentration finale de 0,27 dans 2 ml.

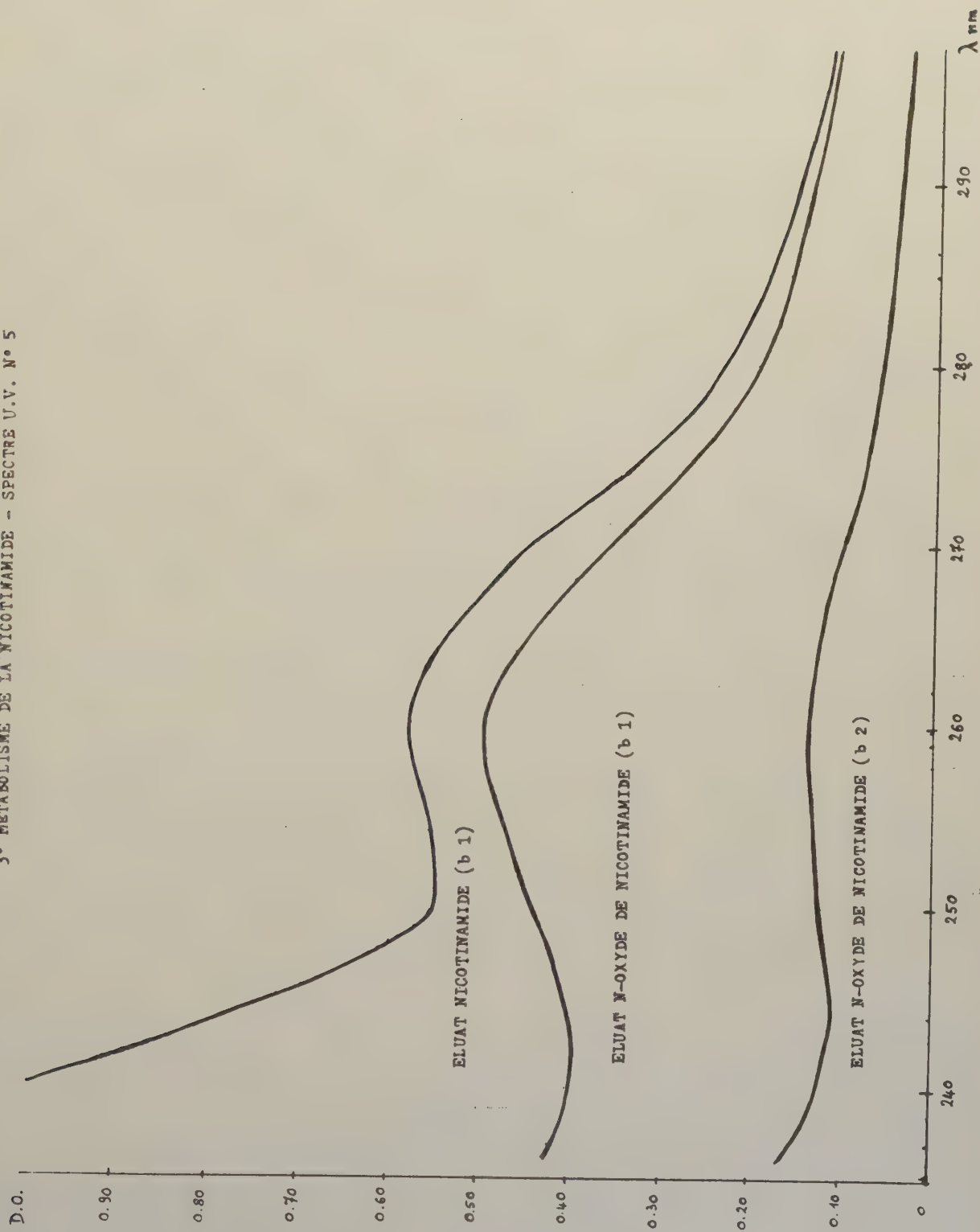
- pour le N-Oxyde de nicotinamide, le maximum d'absorption est à 260 nm (théorique : 259 nm) et le minimum d'absorption est à 242 nm (théorique = 237 nm), ce qui donne une Δ D.O. de 0,20, correspondant à une concentration finale de 0,07 mg. dans 2 ml.

b₂) Le résidu hydrosoluble hydrolysé par l'acide chlorhydrique, chromatographié sur papier avec le solvant "601" donne, pour un dépôt de 200 μ l "en pointillé", deux zones visibles sous lumière U.V. à 254 nm : la première, au niveau du témoin N-Oxyde de nicotinamide, colorée, comme celui-ci, en bleu; la seconde au niveau du témoin nicotinamide, apparaît, identique à celui-ci, en violet-foncé. L'élution de cette dernière donne un spectre (N° 5) sans aucun maximum d'absorption, donc ne renfermant vraisemblablement que des traces de nicotinamide, masquées par les impuretés de l'urine. L'élution de la zone située au niveau du témoin N-Oxyde de nicotinamide, donne un spectre avec une zone maximale d'absorption à 258-261 nm (théorique = 261 nm), et un minimum à 244 nm (théorique = 237 nm). On obtient ainsi une Δ D.O. de 0,05, avec une concentration finale de 0,015 mg dans 2 ml.

Cet éluat est à nouveau chromatographié sur papier, en totalité, avec le solvant à base d'alcool isopropylique-sulfate d'ammonium à 1 % (2:1) et on y retrouve bien le N-Oxyde de nicotinamide, migrant avec un R_f de 0,67 comme le témoin correspondant, ce qui confirme encore l'identité du produit élué à partir de l'urine chromatographiée.

Néanmoins, les spectres U.V. obtenus pour b₁ et b₂, sont très "plats", et la mesure des Δ D.O. est d'autant plus entachée d'erreur.

3° METABOLISME DE LA NICOTINAMIDE - SPECTRE U.V. N° 5



V - CONCLUSION

Les divers essais de métabolisme de la nicotinamide réalisés chez le cobaye, nous permettent d'en conclure que l'"extractif alcoolique" renferme la presque totalité des principes actifs recherchés; le "résidu hydrosoluble" en contient très peu, et encore moins après hydrolyse chlorhydrique. Ceci infirme l'hypothèse d'une élimination urinaire sous forme conjuguée, pour la nicotinamide ou son N-Oxyde.

Du point de vue quantitatif, nous trouvons donc au maximum, en additionnant les quantités présentes dans l'"extractif alcoolique" et dans le "résidu hydrosoluble" ramené à son volume total (donc multiplié par deux puisqu'on n'en avait gardé que la moitié), les quantités suivantes :

- pour la nicotinamide : 2,48 à 3,12 mg sont éliminés dans les urines de 24 heures, après une administration orale de 150 mg de nicotinamide, ce qui représente donc 1,65 % à 2,07 % d'élimination sous forme inchangée.
- pour le N-Oxyde de nicotinamide : 0,79 à 1,13 mg, soit une élimination urinaire de 0,53 % à 0,75 % en 24 heures est observée.

Ces valeurs sont un plus fortes que celles données par BONAVENTA (1961) : 0,54%et 0,38 % de nicotinamide et de N-Oxy-nicotinamide respectivement, dans les urines de 12 heures chez la souris; tandis que CHAYKIN (1965) trouve en moyenne 0,16 % et 0,38 % respectivement, chez la souris encore, et après 4 heures seulement, il est vrai.

Quatrième Chapitre

CORAMINE

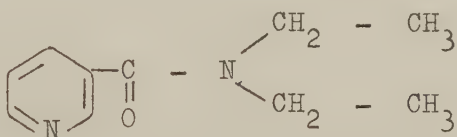
Première Partie

TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA

CORAMINE

I - INTRODUCTION

La Coramine (ou nicéthamide inscrite au Codex 1965) est le diéthylamide de l'acide nicotinique, et répond à la formule suivante :



C'est un stimulant cardiaque, un tonique analeptique cardio-vasculaire et un excitant du centre respiratoire. Chez l'homme, ce médicament est employé en solution aqueuse à 25 % à raison de XX à C gouttes par 24 heures. Il s'agit donc d'une substance relativement toxique, comme le prouve également l'essai chez l'animal, qui indique une DL absolue de 250 à 300 mg par kg pour le cobaye, suivant que la voie d'administration choisie est sous-cutanée ou intra-péritonéale (SPECTOR 1956).

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

a) Etat physique

La Coramine se présente sous l'aspect d'un liquide clair, légèrement visqueux, à faible odeur aromatique et à saveur amère puis brûlante (Codex 1965).

A température ordinaire, elle peut se prendre en masse, et $F = 25^{\circ} \text{C}$. La Coramine donne $E_b = 296-300^{\circ} \text{C}$, à pression atmosphérique, avec décomposition partielle.

Elle est miscible à l'eau, à l'éthanol, à l'éther, au chloroforme, et à l'acétone. Elle est très peu soluble dans le sulfure de carbone et le tétrachlorure de carbone.

On a pu obtenir un picrate de nicéthamide : $F = 106^{\circ}-108^{\circ} \text{C}$ (YAVORSKII 1965), et un nitrate de nicéthamide : $F = 100^{\circ}-102^{\circ} \text{C}$ (Codex 1965).

b) Spectre Ultra-Violet

Selon CIUSA (1959), le spectre U.V. de la Coramine en solution aqueuse présente un maximum d'absorption vers 262 nm. En fonction du pH de la solution, le coefficient d'extinction varie : ainsi dans NaCl 0,1 N (pH = 6,7), $E = 5200$; dans HCl 0,1 N (pH = 1,1), $E = 3600$; dans NaOH 0,1 N (pH = 13), $E = 3300$.

D'après un autre auteur (SUNSHINE 1963), la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption se situerait entre 260 et 263 nm.

c) Spectre Infra-Rouge

Le même auteur (SUNSHINE 1963), donne un enregistrement spectral infra-rouge, d'une solution chloroformique de nicéthamide.

On y retrouve en particulier les bandes d'absorption suivantes : vers $1630-1670\text{ cm}^{-1}$ pour la vibration de valence $\text{C}=\text{O}$ des amides tertiaires; entre $900-1200\text{ cm}^{-1}$ pour les vibrations de déformation des liaisons $\text{C}-\text{H}$ de l'hétérocycle; entre $1480-1650\text{ cm}^{-1}$ pour les vibrations de valence $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{N}$ du noyau; entre $1370-1380\text{ cm}^{-1}$ pour CH_2 , et entre $1450-1465\text{ cm}^{-1}$ pour $\text{C}-\text{CH}_3$.

d) Séparation chromatographique

1. Chromatographies sur papier : tous les essais décrits par les auteurs, sont réalisés par eux sur papier Whatman N° 1.

En 1951, HUEBNER, utilisant du butanol saturé d'ammoniaque 1,5 N comme phase mobile, trouvait un $R_f = 0,84$ pour la Coramine. La même année, KODICEK et REDDI essayaient divers solvants, avec les résultats suivants : Butanol saturé d'eau ($R_f = 0,90$); Isobutanol saturé d'eau ($R_f = 0,91$); Acétone-eau 8:2 ($R_f = 0,89$); Méthyléthylcétone-acide acétique-eau 49:1:50 ($R_f = 0,90$).

Plus tard, VIDIC (1962), s'intéressant à l'analyse chromatographique de diverses substances toxiques, parmi lesquelles la Coramine, préconisa l'emploi des trois systèmes solvants ci-dessous, de préférence en alternance, selon la méthode bidimensionnelle :

= Dichloréthane-acide acétique-eau (10:4:1), sur papier simple.

= Butanol-acide formique-eau (12:1:7), sur papier simple.

= Méthanol-eau-ammoniaque concentrée (6:3:1), sur papier imprégné d'huile d'olive.

Enfin, PAWELCZYK (1966), a fait migrer la Coramine en utilisant un mélange, à parties égales, de butanol et d'ammoniaque 1,5 N, et il a obtenu un $R_f = 0,85$.

2. Chromatographies sur couches minces : En 1962, VIDIC préconisait l'utilisation de plaques de verre recouvertes de Kieselgel, avec une phase mobile renfermant de l'ammoniaque 0,1 N dans du méthanol.

Puis, GUVEN (1966), employant des couches minces de Silicagel, obtint avec le mélange : propanol-ammoniaque à 10 %, un $R_f = 0,87$.

Une modification intéressante fut apportée à cette dernière méthode en faisant varier le milieu dans lequel on met en suspension le Silicagel (FIKE 1966). Ainsi, avec le méthanol comme phase mobile, et suivant que le Silicagel est mis en suspension dans une solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium, ou dans une solution 0,1 M de sulfate acide de sodium, on trouve $R_f = 0,64$ ou $R_f = 0,38$, pour la Coramine.

e) Réactions de caractérisation

Selon le CODEX 1965, si l'on chauffe à 70° C un mélange de nicéthamide à 25 % (10 ml), avec du nitrate de cobalt à 10 % (5 ml) et du sulfo-cyanure de potassium à 20 % (5 ml) il apparaît, après refroidissement, un précipité bleu, qui vire au rose par chauffage.

En remplaçant le sel de cobalt par du sulfate de cuivre, on obtient un précipité vert. GUVEN (1966) emploie une réaction analogue, avec du sulfate de cuivre et de l'ammoniaque pour visualiser sur chromatographie les spots de Coramine, qui apparaissent colorés en bleu-vert.

Sur les chromatogrammes, on peut révéler la Coramine par le réactif de DRAGENDORFF modifié (KAISER 1954, PAWELCZYK 1966), par l'examen sous U.V. ou par diverses modifications de la réaction de KÖNIG (1904) au bromure de cyanogène, caractéristique du noyau pyridinique.

Ainsi SANCHEZ (1944) révèle la présence de Coramine, par hydrolyse à chaud, en milieu sulfurique, qui libère la diéthylamine et l'acide nicotinique. Ce dernier est mis en évidence avec du bromure de cyanogène et de la benzidine en solution dans l'éthanol, qui donnent une coloration rouge. La même réaction est utilisée par HUEBNER (1951), directement sur un spot de

Coramine obtenu par chromatographie, qui se révèle par une coloration violacée à partir de 5 μ g de substance.

Plus tard, D'ALESSIO (1958) signale qu'il suffit, après chauffage du bromure de cyanogène avec la solution de Coramine, d'ajouter une solution alcaline (telle que carbonate de sodium, ammoniacque, hydroxyde de sodium, de calcium ou de baryum) pour obtenir une coloration variant du jaune au rose. Dans ces conditions, la nicotinamide n'interfère pas, car elle ne donne qu'une fluorescence bleue dans l'ultra-violet.

f) Dosage de la Coramine

1. Après hydrolyse : On peut doser l'acide nicotinique par hydrolyse de la Coramine. La méthode de SANCHEZ (1944) au bromure de cyanogène et à la benzidine est applicable quantitativement.

Une autre réaction colorée au bromure de cyanogène en présence de tampon phosphaté (phosphate monopotassique pH = 5,5) est obtenue par chauffage à 80° C; on ajoute alors du métol (sulfate de p-méthyl-aminophénol) puis on colorimètre vers 400 nm (ELLINGER 1949).

On pourrait aussi appliquer la méthode de MUELLER (1951) au bromure de cyanogène en présence d'ammoniacque, en milieu tamponné, et colorimétrer vers 410 nm.

2. Dosage direct : A une solution aqueuse, renfermant 10 à 75 μ g de Coramine par ml, on peut ajouter 1 ml de solution alcoolique d'aniline à 4 %, et compléter à 10 ml avec du bromure de cyanogène (eau bromée décolorée par addition d'une solution aqueuse de KCN à 10 %). Après agitation et repos pendant 15 mn, on mesure la D.O. à 436 nm (WALLEN 1947).

Une autre réaction utilisant du bromure de cyanogène et de l'acide barbiturique en milieu tamponné et à chaud, peut servir à doser la Coramine à 505 ou 560 nm. L'auteur (PELLETIER 1962) propose deux versions à sa méthode, l'une normale, l'autre rapide : la première est plus spécifique cependant. Cette méthode convient pour de faibles quantités, de l'ordre de 2 μ g dans la prise d'essai.

Enfin, il faut signaler un autre type de réaction, caractéristique de la fonction amide, et qui consiste en une transformation en acide hydroxamique, sous l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine en milieu alcalin, à 26° C, pendant 8 heures, suivie d'une combinaison avec le perchlorure de fer en milieu acide. On obtient une coloration rouge, se prêtant à un dosage colorimétrique (BERGMANN 1952). Les esters et les anhydrides réagissent aussi, mais en des temps et à des températures différents. La Coramine réagit avec une intensité environ sept fois moindre que la nicotinamide, car sa fonction amide est bloquée.

III - ETUDE DU METABOLISME DE LA CORAMINE

D'après la documentation aimablement fournie par la société CIBA, la Coramine serait très rapidement métabolisée, en quelques heures. Ainsi chez le lapin, après injection I.V. de Coramine, on n'en retrouve que 3-4 % sous forme inchangée dans les urines (HARTMANN 1938).

L'extraction à partir de l'urine est réalisée par concentration sous vide à 80° C, jusqu'à réduction de moitié. Après saturation par du chlorure de sodium, on ajoute de l'acétone afin de faire précipiter les pigments. On centrifuge pour éliminer le précipité. On évapore l'extrait acétonique. On reprend par l'eau et on hydrolyse éventuellement par une solution acide ou alcaline (ELLINGER 1949).

L'équipe de ELLINGER (1944-1949) et COULSON (1946) s'est intéressée au métabolisme de la nicotinamide chez l'homme et le cobaye, et accessoirement à celui de la Coramine. Les auteurs ont montré que, chez l'homme adulte de même que chez le nouveau-né, la Coramine se transformait lentement en nicotinamide, qui s'élimine sous forme N-méthylée dans l'urine. Ce métabolite est dosé par fluorimétrie avec l'acétone en milieu alcalin, selon la méthode de HUFF (1947).

Du point de vue quantitatif, ils ont administré 100 mg de Coramine per os à l'homme, et au bout de deux jours, ils ont retrouvé 6,2 % de nicotinamide et 5,8 % de N-méthyl-nicotinamide dans les urines.

Chez le cobaye, l'administration de 25 à 50 mg de Coramine entraîne une élimination de 12,7 à 20,4 % d'acide nicotinique et 12,9 à 10,3 % de nicotinamide. De plus le cobaye élimine en faible quantité une substance inconnue, donnant une réaction de fluorescence avec l'acétone en milieu alcalin, et par ailleurs ne réagissant pas avec le bromure de cyanogène.

IV - CONCLUSION

Les travaux concernant le métabolisme de la Coramine semblent peu nombreux. Il en ressort que celui-ci débiterait par une hydrolyse en nicotinamide, qui suivrait alors le même sort que cette vitamine dans l'organisme.

Deuxième Partie

TRAVAUX PERSONNELS SUR LA CORAMINE

Etant donné les analogies de constitution entre la nicotinamide (amide de l'acide nicotinique) et la Coramine (diéthylamide nicotinique, nicéthamide Codex), il nous a paru également intéressant de rechercher, parmi les métabolites de ce dernier composé chez le cobaye, la présence de dérivés du type N-Oxyde.

Avant d'entreprendre des essais chez l'animal, nous avons commencé par une étude physico-chimique comparée, des propriétés de la Coramine et de son N-Oxyde. Ce dernier, préparé par nos soins pour la première fois, sera appelé, pour plus de commodité, en abrégé CNO. Pour tous ces travaux personnels, nous avons utilisé de la Coramine, aimablement fournie par les laboratoires CIBA.

I - SYNTHESE DU N-OXYDE DE CORAMINE

La méthode de VON EULER (1958 b), nous ayant donné de bons résultats pour la préparation du N-Oxyde de nicotinamide, nous nous en sommes inspiré pour tenter une synthèse, à notre connaissance inédite, du N-Oxyde de Coramine.

Pour cela, nous avons dissous la Coramine base (2 g) dans 8 ml d'acide acétique pur, cristallisable, puis nous avons ajouté peu à peu de l'eau oxygénée concentrée, à 100 volumes (4 ml). Le mélange réactionnel fut maintenu pendant 48 heures dans un bain de sable thermorégularisé à 65° C, puis traité par le noir de platine afin d'éliminer l'eau oxygénée en excès.

Après centrifugation, la liqueur débarrassée de noir de platine, fut concentrée sous pression réduite, à 60° C, dans un évaporateur rotatif, jusqu'à obtention d'un résidu sec.

Celui-ci, repris par le benzène chaud afin de solubiliser un excès éventuel de Coramine, abandonna une fraction insoluble, que l'on réussit à dissoudre dans le méthanol chaud (70° C).

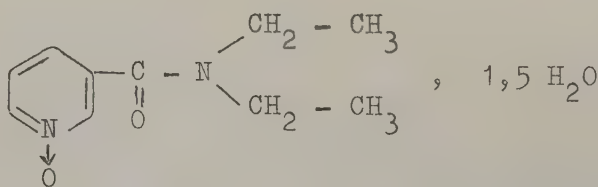
La liqueur, évaporée sous vide, fournit après plusieurs recristallisations dans le méthanol, des cristaux blancs, très hygroscopiques.

L'analyse élémentaire du produit ainsi synthétisé, conduit aux résultats suivants :

C% 41,89 à 42,14 % ; H% 5,89 à 5,96 % ; N% 9,31 à 9,46 % ; O% 19,57 à 19,79%

Ils conduisent à la formule brute suivante : $C_{10}H_{17}O_{3,5}N_2$

ce qui correspondrait au N-Oxyde de Coramine, cristallisant avec 1,5 molécule d'eau :



II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Nous nous sommes proposé d'étudier successivement les points de fusion, solubilités, spectres ultra-violet et infra-rouge, chromatographies et réactions d'identification, du Coramine-N-Oxyde (CNO en abrégé) comparés chaque fois que cela était possible à la Coramine (C en abrégé).

a) Points de fusion :

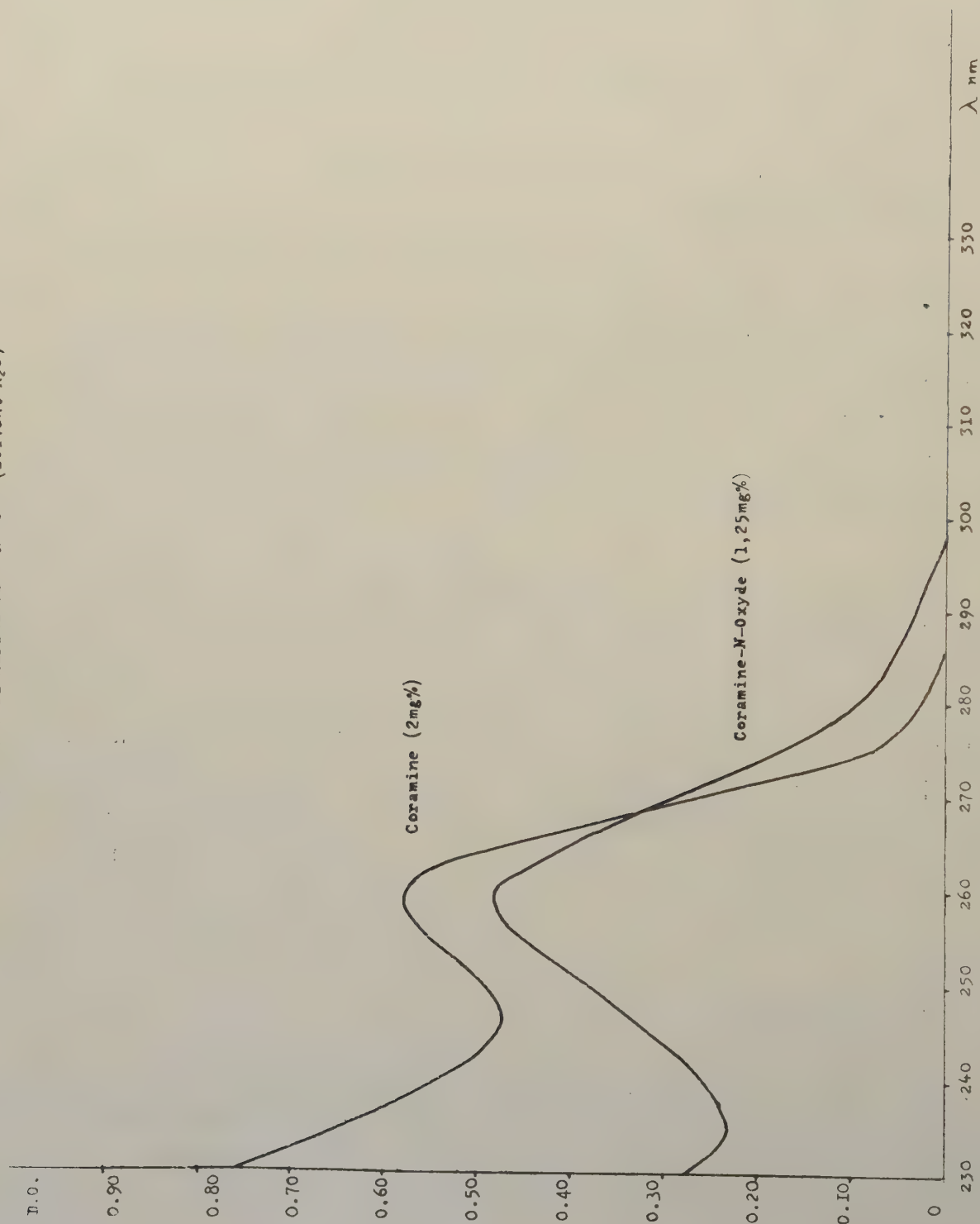
La mesure du point de fusion instantané de CNO est rendue très délicate par son caractère extrêmement hygroscopique, qui se manifeste par son passage rapide à l'état pâteux dès qu'on le manipule à l'air, au lieu de le conserver sous vide. Des mesures répétées, nous permettent de situer ce point de fusion entre 100° et 150° C, tandis que la Coramine fond entre 24° et 26° C. Le point de fusion sous vide, en tube scellé, au bain d'huile, donne : $F = 182^{\circ}$ C pour CNO.

Nous avons alors préparé un picrate de CNO, en faisant agir une solution saturée d'acide picrique dans l'éthanol sur une solution de CNO. Après un repos de 24 heures, nous avons gratté les parois afin d'accélérer la cristallisation, puis filtré, et dissous les cristaux restés sur le filtre dans l'éthanol. Plusieurs recristallisations dans l'éthanol, nous ont finalement laissé des cristaux jaunes, qui, séchés sous vide, avaient un point de fusion instantané à 330° C, tandis que le picrate de nicéthamide fond à 106° - 108° C (YAVORSKII 1965), et l'acide picrique à 129° C (Codex 1965).

b) Solubilités :

Le N-Oxyde de Coramine, préparé par nos soins, est très soluble dans l'eau et dans le méthanol chaud, mais insoluble dans le benzène; tandis que la Coramine est miscible à l'eau, et peu soluble dans le benzène.

SPECTRES U.V. DE REFERENCE - N° 6 - (solvant H₂O)



c) Spectre Ultra-Violet :

Si l'on compare les spectres ultra-violet de la Coramine et de son N-Oxyde en solution dans l'eau (spectres U.V. N° 6), on constate que de l'un à l'autre, la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption subit un léger déplacement hypsochrome de un ou deux nm, tandis que pour le minimum d'absorption ce déplacement vers les courtes longueurs d'onde est plus marqué, de l'ordre de 10 nm. Par ailleurs, on note un effet hyperchrome du N-Oxyde par rapport à la Coramine, dont les coefficients d'extinction sont respectivement de 380 et 290 en moyenne, toujours en solution aqueuse.

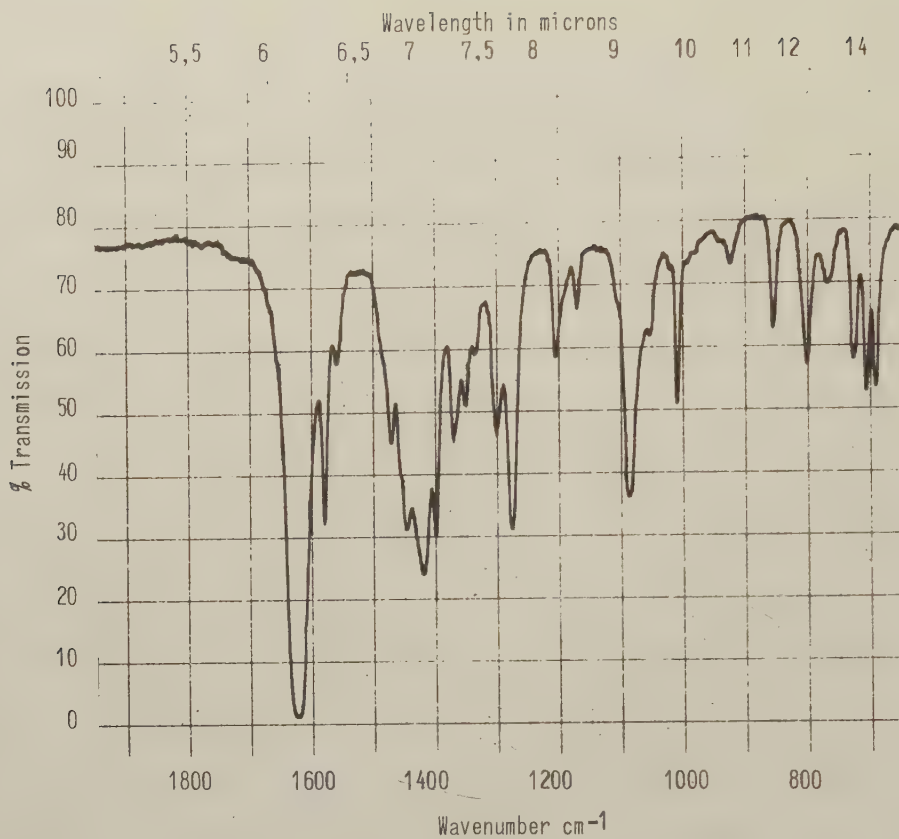
	Longueurs d'onde		Coefficients d'extinction $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (eau) à λ Maximum
	λ Maximum	λ Minimum	
Coramine	260-261 nm	245-248 nm	E = 290
Coramine N-Oxyde	259 nm	235-237 nm	E = 380

Nous retrouvons ici, comme dans le cas de la nicotinamide et de son N-Oxyde, le déplacement hypsochrome et l'effet hyperchrome, dûs à l'introduction d'un atome d'oxygène sur l'atome d'azote pyridinique de la Coramine.

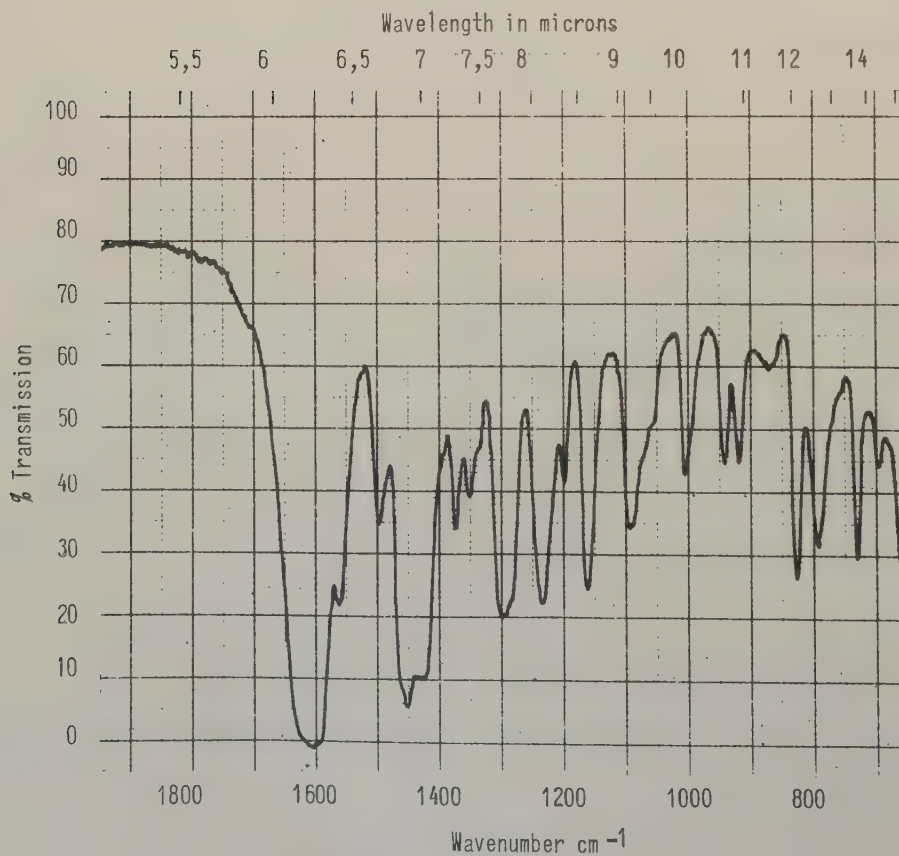
d) Spectre Infra-Rouge :

L'étude par spectrographie infra-rouge de la Coramine et de CNO, a été réalisée, en employant la technique du pastillage.

Dans le cas de la Coramine, qui se présente à la température ordinaire sous l'aspect d'un liquide visqueux, il a fallu avoir recours à un petit artifice : nous avons réalisé à la presse hydraulique (8 tonnes/cm²) deux pastilles minces et transparentes, de 175 mg de KBr, entre lesquelles nous avons déposé une micro-goutte de Coramine (0,7 mg), puis nous avons comprimé à nouveau l'ensemble afin d'obtenir un film homogène entre les deux pastilles. Le spectre obtenu est semblable à celui de SUNSHINE (1963), réalisé en solution chloroformique.



CORAMINE
SPECTRE I.R. N°5



CORAMINE N-OXYDE
SPECTRE I.R. N°6

Pour le Coramine N-Oxyde, qui est cristallisé quand on le conserve sous vide, mais très hygroscopique, et par conséquent devenant immédiatement pâteux à l'air, nous avons adopté la même technique. Nous avons ainsi inséré 1,6 mg de CNO entre deux pastilles minces de 130 mg de KBr, et comprimé le tout à la presse hydraulique.

En nous reportant à divers ouvrages (BELLAMY 1956, CROSS 1967, FREEMAN 1965, MILLER 1965), nous avons pu repérer les diverses bandes d'absorption ci-dessous :

= pour la Coramine (spectre I.R. N° 5) nous retrouvons la vibration de valence C=O des amides tertiaires à 1630 cm^{-1} ; la vibration de valence C-N hétérocyclique à 1580 cm^{-1} ; et 5 bandes correspondant aux vibrations de déformation des liaisons C-H du noyau, de CH_2 et de C-CH_3 , entre 1370 et 1465 cm^{-1} .

= pour le Coramine N-Oxyde (spectre I.R. N° 6), nous retrouvons sensiblement les mêmes caractéristiques, mais en plus une bande importante à 1235 cm^{-1} , qui correspond vraisemblablement à la liaison N-O du N-Oxyde hétérocyclique.

e) Systèmes chromatographiques utilisés :

Nous avons procédé à l'essai de divers solvants qui nous semblaient susceptibles de convenir à la séparation de la Coramine et de son N-Oxyde, certains ayant déjà été utilisés avec succès pour la nicotinamide. L'essai a été réalisé soit sur papier WHATMAN N° 1, soit sur couches minces de gel de silice.

= Chromatographies sur papier :

Solvant	Papier	Migration		Rf	
		Temps	Hauteur	Coramine	C N O
Butanol saturé d'eau	phosphaté	3 h.30	(151 mm)	0,93	0,73
Butanol saturé eau-acide acétique (60:1)	simple	4 h.30	(147 mm)	0,87	0,67
Butanol-acide formique-eau (77:10:13)	simple	1 h.50	(127 mm)	0,82	0,66
Alcool isopropylique-sulfate d'ammonium à 1 % (2:1)	simple	5 h.15	(138 mm)	0,93	0,85
	sulfaté	3 h.30	(120 mm)	0,96	0,90
Acétone-eau (7:3)	simple	1 h.15	(115 mm)	0,88	0,67
Propanol-eau (8:2)	simple	1 h.15	(79 mm)	0,89	0,74
Propanol-eau (6:4)	simple	1 h.30	(91 mm)	0,92	0,88
Butanol-acide acétique-eau (4:1:5)	simple	4 h.	(138 mm)	0,89	0,73
Butanol-acide acétique-eau (100:14:38)	simple	4 h.	(147 mm)	0,86	0,71
Butanol sat. eau-acide formique (30:7)	simple	2 h.30	(160 mm)	0,87	0,77
Alcool amylique-acide acétique-eau (6:3:3)	simple	1 h.30	(75 mm)	0,87	0,85
Butanol sat. ammoniac (N)	simple	2 h.	(101 mm)	0,84	0,64

Les valeurs de Rf indiquées , correspondent aussi bien aux corps purs isolés, qu'au mélange de la base et du N-Oxyde de Coramine. Nous avons retenu de ces essais, l'intérêt du solvant à base de butanol saturé d'eau et acide acétique (60:1), que nous avons utilisé par la suite pour les études des produits de métabolisme. Le solvant renfermant : butanol-acide formique-eau (77:10:13) est intéressant pour sa rapidité de développement des chromatogrammes, mais il donne une séparation un peu moins nette.

En ce qui concerne la chromatographie sur couches minces, nous avons procédé à quelques essais, décrits ci-après.

= Chromatographies sur couches minces : nous disposons de films de plastique KODAK K 301 V, recouverts d'un gel de silice très fin, avec un liant à base d'alcools polyvinyliques, et de plaques MERCK en verre mince recouvertes de Kieselgel F 254, c'est-à-dire d'une couche de silice mélangée à un indicateur fluorescent à 254 nm. Nous les avons essayés en parallèle avec trois solvants différents.

Nous avons regroupé nos résultats sous la forme d'un tableau :

	Rf et Migration (mm/lan) Coramine		Rf et Migration (mm/mn) N-Oxyde de Coramine	
	Silice KODAK	Silice MERCK	Silice KODAK	Silice MERCK
Isopropanol-ammoniaque (N)-eau (20:1:2)	0,76 (37 mm/50 mn)	0,64 (52 mm/50 mn)	0,48 (37 mm/50 mn)	0,48 (52 mm/50 mn)
Méthanol-ammoniaque concentrée (99:1)	0,65 (82 mm/50 mn)	0,73 (78 mm/30 mn)	0,52 (82 mm/50 mn)	0,64 (78 mm/30 mn)
Propanol-ammoniaque (N) (95:5)	0,66 (38 mm/50 mn)	0,67 (57 mm/50 mn)	0,34 (38 mm/50 mn)	0,35 (57 mm/50 mn)

Ces essais nous amènent à conclure que, sur film de silice KODAK, la meilleure discrimination est obtenue avec le dernier solvant à base de propanol et d'ammoniaque, tandis qu'avec les plaques de verre MERCK, le solvant à base de méthanol et d'ammoniaque, donne les meilleurs résultats.

f) Réactions d'identification :

Afin d'identifier le N-Oxyde de Coramine, nous avons eu recours à diverses réactions colorées, et à la réduction en Coramine, étayées par l'analyse élémentaire.

Les réactions colorées ont été menées simultanément sur la Coramine et sur son N-Oxyde. Elles ont donné les résultats suivants :

	Coramine	N-Oxyde de Coramine
Irradiation U.V. à 254 nm	violet	violet-bleu, devenant rose après 10 mn d'irradiation.
Irradiation U.V. à 366 nm	mauve	mauve, puis rosé après 10 mn d'irradiation
Réactif de DRAGENDORFF modifié (BILINSKI)	rouge orangé à centre plus clair et granité	orangé-clair
R. Naphtylamine-sulfanilique après irradiation U.V. (FRUSSMANN)	jaune sur fond rose après 24 h.	rose foncé après 24 h.
Solution éthérpétrolique d'iode	marron à bord foncé	brun-clair
Réactif iodoplatinique	jaune	brun
Réaction à la ninhydrine	mauve-gris	0
R. 2-4-dinitrochlorobenzène (DANILOVIC)	mauve, devenant brun-clair en 24 h.	0, devenant légèrement beige en 24 h.
R. hydroxylamine-perchlorure de fer (ROBERTSON)	très léger jaune-pâle	0
R. sulfate de cuivre-ammoniaque (GUVEN)	bleu-vert	0
R. p-nitraniline-sulfanilique (BICKEL)	jaune	très léger jaune-pâle
R. bromure de cyanogène-aniline (JONES)	rouge-orangé	jaune très pâle
R. bromure de cyanogène-benzidine (HUEBNER)	jaune-vif devenant orange	jaune-or pâle

A l'issue de ces divers essais, il est intéressant de noter la fluorescence rosée qui se manifeste après irradiation des spots chromatographiques de N-Oxyde de Coramine; de plus cette transformation s'accompagne d'une coloration brune, dans le visible, qui facilite le repérage des spots.

Nous avons pu constater par ailleurs que l'irradiation U.V. à 254 nm, pendant une heure et demie, d'une solution diluée de CNO (1,6 mg/100 ml d'eau), sous 1 mm d'épaisseur environ, entraînait la disparition du maximum d'absorption situé normalement à 259 nm pour le N-Oxyde de Coramine, tandis que se manifestait une légère absorption entre 300 et 400 nm, qui n'existait pas au départ. Cette transformation photochimique s'accompagne vraisemblablement de l'ouverture du cycle pyridinique, dont la caractéristique principale dans l'U.V. est un pic d'absorption vers 260 nm.

Par contre, dans des conditions analogues, une solution aqueuse diluée de Coramine (2 mg/100 ml), irradiée sous 1 mm d'épaisseur, à 254 nm, pendant 75 minutes, conserve intacte son absorption à 260 nm, lorsqu'on enregistre son spectre U.V., tandis qu'apparaît une absorption entre 280 et 400 nm, avec un petit pic vers 360-370 nm.

Il semble donc, que la fonction N-Oxyde fragilise le noyau pyridinique, et le rende photosensible, tout au moins dans le cas de la Coramine qui nous intéresse présentement.

Nous constatons aussi, -comme dans les cas précédemment cités du TMAO et du nicotinamide-N-Oxyde-, que la basicité diminuée du N-Oxyde par rapport à l'amine de départ, entraîne une réaction moins intense au réactif de DRAGENDORFF. Il semble que, d'une façon générale, avec tous les réactifs utilisés, le N-Oxyde de Coramine réagisse moins que la Coramine elle-même.

Dans le cas particulier des réactions au bromure de cyanogène de HUEBNER et de JONES, nous voyons que le N-Oxyde ne réagit pratiquement pas (la légère coloration jaune-pâle observée étant due à la solution d'aniline), ce qui prouve bien que l'azote hétérocyclique de la pyridine est bloqué par un atome d'oxygène, empêchant ainsi la formation du bromure de cyano-pyridinium habituel, qui est bien obtenu dans les mêmes conditions avec la Coramine, et qui se manifeste par la coloration rouge-orangé qu'il donne avec une amine aromatique telle que l'aniline ou la benzidine.

Afin de compléter la caractérisation du CNO synthétisé, nous avons eu recours aux méthodes de réduction par l'acide oxalique, le chlorure de titane, ou l'hydrogène, suivies de chromatographies, permettant de montrer la transformation du N-Oxyde en Coramine.

= Réduction par l'acide oxalique : Nous avons utilisé une solution réductrice renfermant 1,4 g d'acide oxalique pour 100 ml d'acide chlorhydrique à 5 %. Puis nous avons calculé la quantité théoriquement nécessaire à la réduction du N-Oxyde, et nous en avons ajouté un excès de 10 %.

Le mélange réactionnel renfermait finalement : 10 mg de CNO dans 6 ml de la solution d'acide oxalique précédente. Après un contact de 12 heures, suivi d'évaporation à sec au bain de sable, et reprise par 1 ml d'eau distillée, la chromatographie sur papier d'un dépôt de 20 μ l, entouré de deux témoins Coramine et CNO, par le solvant : butanol saturé d'eau-acide acétique (60:1), a donné les résultats suivants. Une migration de 5 heures, puis une révélation des spots, d'abord sous lumière U.V., puis par pulvérisation éthéropétrolique d'iode, permet de situer la Coramine à $R_f = 0,88$, CNO à $R_f = 0,65$, et le produit traité par l'acide oxalique à $R_f = 0,57$. Ce dernier apparaît en beige sous U.V. à 254 nm, tandis que les deux témoins cités sont violet-foncé.

Cet essai n'étant pas concluant, et dans l'hypothèse d'une éventuelle transformation en oxalate de Coramine, nous avons pensé traiter le mélange réactionnel précédent par l'ammoniaque, afin de libérer la Coramine base. L'étude réalisée par chromatographie comme précédemment, a donné les résultats suivants : $R_f = 0,87$ pour la Coramine, $R_f = 0,67$ pour CNO, $R_f = 0,67$ pour le produit de réaction. Nous retrouvons ainsi le produit de départ, le Coramine N-Oxyde inchangé. L'acide oxalique est donc un réducteur insuffisant pour s'attaquer à ce N-Oxyde de la série pyridinique, ce qui confirme les travaux de OCHIAI (1953) mettant en évidence la

particulière stabilité des N-Oxydes hétérocycliques vis-à-vis de la réduction; et qui serait due à la résonnance de la liaison N-O avec le noyau hétérocyclique (ACHER 1964).

= Réduction par le trichlorure de titane : Nous inspirant de la méthode de BROOKS et STERNGLANZ (1959) pour le dosage titanométrique des N-Oxydes pyridiniques, nous avons fait agir une solution aqueuse de $TiCl_3$ à 15 % (1 ml) sur CNO (50 mg), à pH = 1, en présence d'acide chlorhydrique au 1/10, pendant trente minutes; puis après évaporation sous vide et reprise par 1 ml d'eau distillée, nous avons étudié le mélange en chromatographie sur papier phosphaté, avec le solvant : butanol-acide formique-eau (77:10:13). Un développement du chromatogramme pendant deux heures (sur 147 mm), puis une révélation au réactif de DRAGENDORFF modifié par BILINSKI, donne les résultats suivants : $R_f = 0,89$ pour la Coramine; $R_f = 0,79$ pour CNO; $R_f = 0,25$ principalement pour le mélange réactionnel mais avec une traînée orangée jusqu'au niveau du témoin Coramine.

Il semble donc qu'une réduction partielle se soit opérée, en présence de chlorure de titane, sur le N-Oxyde de Coramine.

Afin d'obtenir une réduction plus poussée, nous avons recommencé l'expérience, en chauffant le mélange réactionnel pendant 10 minutes au bain-marie bouillant. La chromatographie sur papier de l'extrait concentré, avec le même solvant, donne après 1 h.40 de développement (sur 137 mm) plusieurs spots apparaissant en violet sous U.V. à 254 nm, et se colorant en orangé au réactif de DRAGENDORFF modifié : pour la Coramine $R_f = 0,81$; pour CNO $R_f = 0,67$; et pour le produit de la réaction : $R_f = 0,29$ principalement, avec une traînée jusqu'au niveau de la Coramine témoin.

Les résultats obtenus sont donc à peu près identiques, en opérant à la température ordinaire, ou à 100° C, conduisant à la transformation partielle en Coramine, et à la formation d'un produit nouveau à faible R_f , et qui est peut-être un complexe à base de titane et de Coramine.

Nous avons cherché à le mieux identifier, en procédant à une chromatographie bidimensionnelle sur papier avec le même solvant, en nous entourant des deux témoins habituels. Le spot violet repéré sous U.V. à 254 nm, dont le $R_f = 0,25$ dans la première dimension, et $R_f = 0,21$ dans la seconde dimension, fut élué par quelques ml d'eau distillée chaude. Après centrifugation, l'enregistrement du spectre ultra-violet donne les résultats suivants, comparés à ceux que l'on obtient avec le spot de Coramine témoin élué dans les mêmes conditions :

	Longueurs d'onde	
	λ Maximum	λ Minimum
Produit de réaction	261 nm	245-247 nm
Coramine témoin	261 nm	247 nm

Ces résultats semblent bien confirmer l'hypothèse selon laquelle il se serait formé un complexe avec le sel de titane, puisque son spectre U.V. est tout à fait analogue à celui de la Coramine elle-même.

= Réduction catalytique par l'hydrogène : Nous avons essayé la méthode préconisée par STEVENS (1958) pour réduire les N-Oxydes de purines. Pour cela, nous avons fait passer un courant d'hydrogène (purifié sur plombite de sodium pour le débarrasser de H_2S éventuellement présent) dans une solution renfermant 30 mg de CNO dans 10 ml d'ammoniaque à 1 %, en présence de Nickel de RANEY (0,5 g environ). Nous avons opéré à pression atmosphérique. Au bout de 20 à 25 minutes le volume d'hydrogène reste constant et l'on peut donc considérer que la réaction est terminée.

On centrifuge alors à 4000 t/mn pendant 10 minutes, pour éliminer le catalyseur. Puis après évaporation à un faible volume, la liqueur est analysée en chromatographie sur papier, avec le solvant : butanol-acide formique-eau (77:10:13), en s'entourant des témoins Coramine et CNO.

Un développement de 2 heures (sur 133 mm) laisse apparaître après examen sous U.V., puis pulvérisation de réactif de DRAGENDORFF modifié, les spots suivants : Coramine témoin ($R_f = 0,79$); CNO témoin ($R_f = 0,63$); et enfin produit d'hydrogénation ($R_f : 0,79$).

Nous voyons ainsi que, la meilleure méthode de réduction, dans le cas du N-Oxyde de Coramine, semble être l'hydrogénation catalytique sur Nickel de RANEY, puisqu'elle a totalement transformé CNO en Coramine, le spot obtenu par chromatographie étant unique et très net, sans aucune traînée, comme c'était le cas lors de la réduction par $TiCl_3$.

III - METHODES DE DOSAGE

Les méthodes de dosage s'appliquant à la Coramine elle-même, ayant été décrites au cours de l'exposé des travaux antérieurs, nous ne mentionnerons ici que la méthode que nous avons choisie pour les dosages dans les urines obtenues après métabolisation par l'animal.

Nous avons opéré comme pour la nicotinamide. C'est-à-dire que nous avons enregistré le spectre U.V. de la solution à doser renfermant du N-Oxyde de Coramine, puis nous avons mesuré la hauteur du pic enregistré ou Δ D.O., au niveau du maximum d'absorption, selon la méthode de "background cancellation" décrite par BOLT et FORREST (1967).

Pour l'application de cette méthode et en fonction du tracé des spectres U.V. de la Coramine et de son N-Oxyde, nous voyons qu'il faudra mesurer les densités optiques à :

235, 259 et 285 nm pour le Coramine N-Oxyde;	} (Figure 9)
240, 261 et 280 nm pour la Coramine	

En opérant ainsi à diverses concentrations, nous avons pu tracer une courbe d'étalonnage pour CNO, indiquant la concentration en mg/l en fonction de la mesure de Δ D.O. C'est une droite passant par l'origine, dans l'intervalle de concentration envisagé (de 0,2 à 1,6 mg/100 ml). Cette courbe d'étalonnage nous a servi par la suite à doser les produits de métabolisme (figure 10).

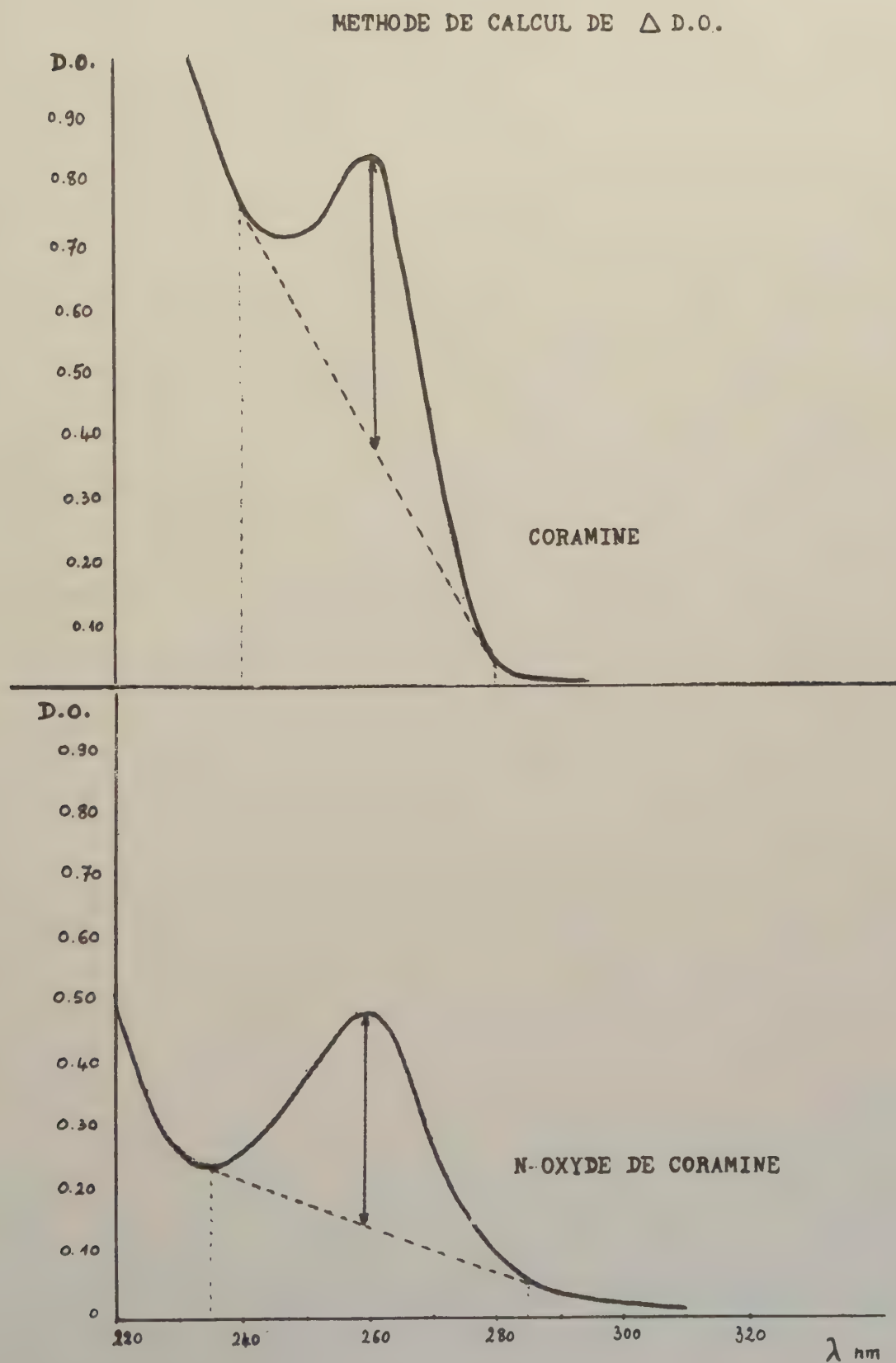


Figure 9

Courbe d'étalonnage : Ceramine-N-Oxyde

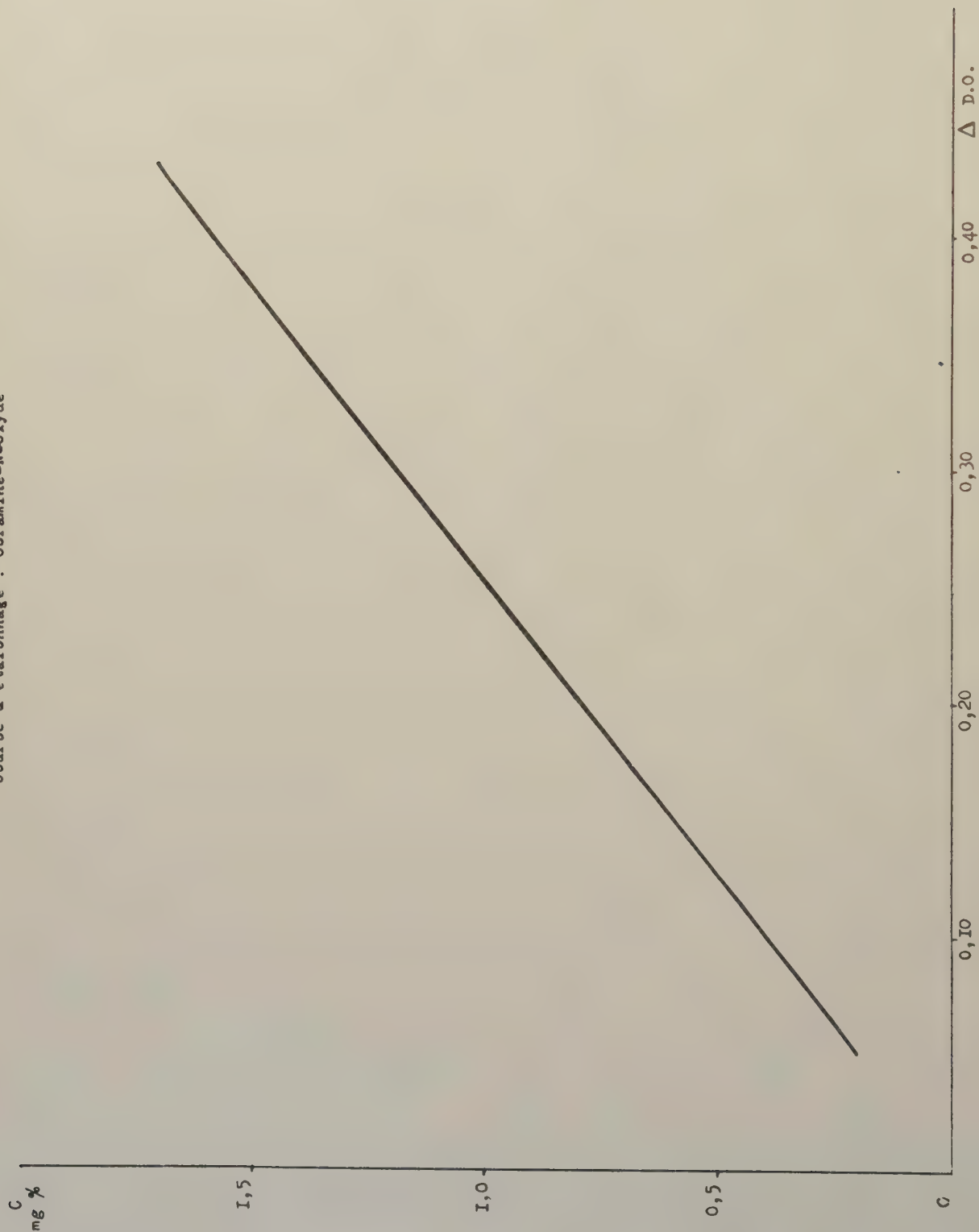


Figure 10

IV - ESSAIS CHEZ L'ANIMAL

Le même protocole opératoire que dans le cas de la nicotinamide, a été adopté ici.

Nous avons tenté à nouveau de purifier l'urine issue du métabolisme de la Coramine chez le cobaye, en ayant recours au traitement par l'uréase.

Comme pour les essais précédents, réalisés sur l'urine excrétée après administration de nicotinamide, nous avons ajouté à 10 ml d'urine filtrée, 10 ml de solution d'uréase à 1 %, et 2 ml de tampon phosphate à pH 6,8. Nous avons placé le tout dans une fiole d'erlenmeyer avec un système d'agitation magnétique, termorégularisé à 37° C, pendant 30 minutes.

La liqueur filtrée et centrifugée, afin d'éliminer totalement la suspension d'uréase, est concentrée sous vide, puis soumise à chromatographie sur papier, avec le solvant : butanol saturé d'eau et acide acétique (60:1). Une migration de 15 heures, sur 250 mm, ne laisse apercevoir, après révélation par pulvérisation de réactif de DRAGENDORFF modifié, qu'une longue traînée orange, sans aucun spot net au niveau des témoins Coramine ($R_f = 0,88$) ou CNO ($R_f = 0,67$).

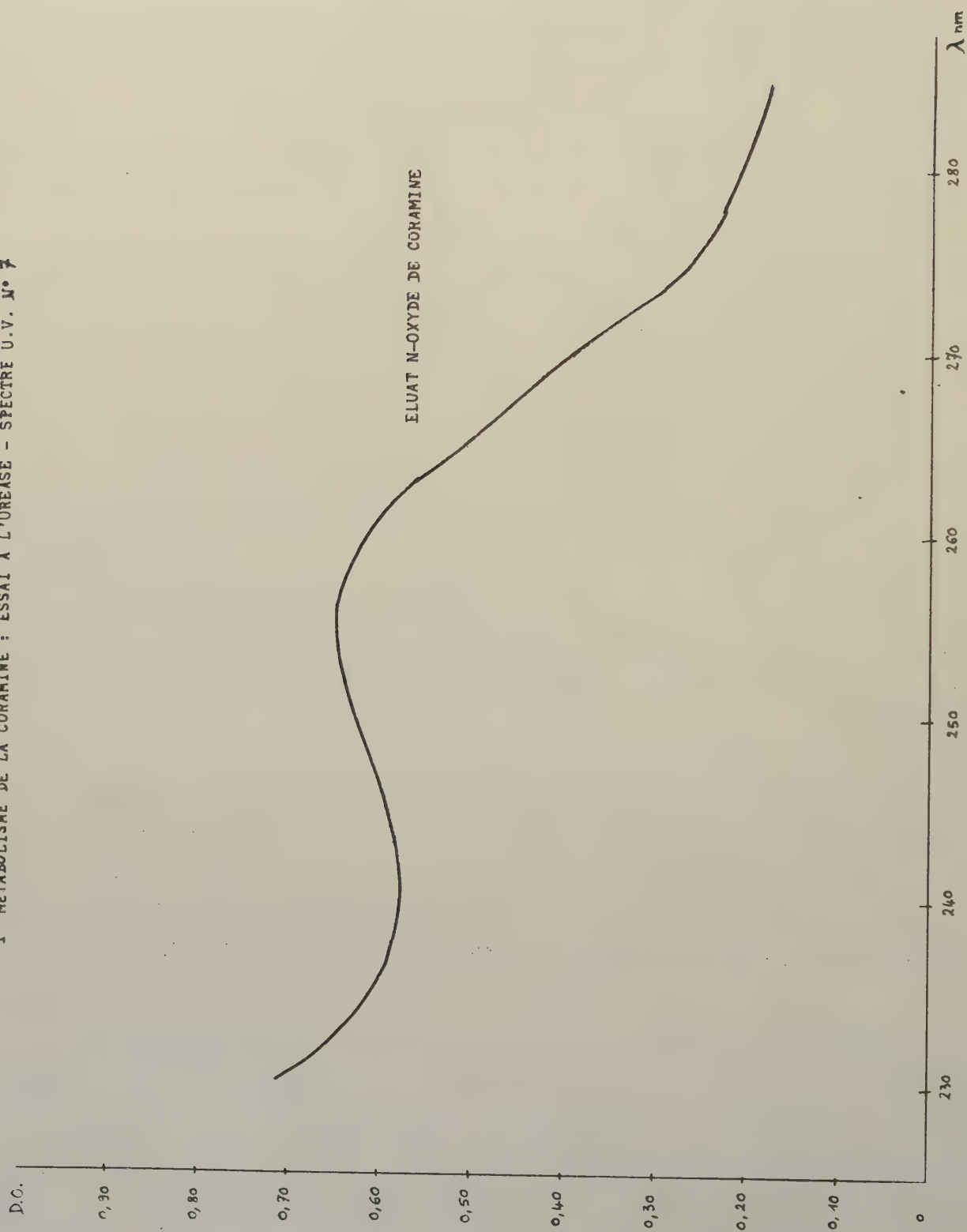
Devant cet échec nous avons pensé avoir recours à un mélange d'urine témoin filtrée (10 ml), Coramine (20 mg) et CNO (20 mg), uréase à 1 % (10 ml) et tampon phosphate pH = 6,8 (2 ml), que nous avons traité comme précédemment, mais soumis en fin à une chromatographie bidimensionnelle sur papier, en double exemplaire, avec le même solvant "601".

Après un développement de 2 h.30 dans le premier sens, et de 1 h.50 dans le deuxième, nous avons pu localiser les spots selon la technique habituelle (examen sous U.V., pulvérisation de la solution éthéropétrolique d'iode ou de réactif de DRAGENDORFF):

Coramine témoin ($R_f = 0,80$), Coramine dans l'urine ($R_f = 0,79$)

CNO témoin ($R_f = 0,59$), CNO dans l'urine ($R_f = 0,58$).

I° METABOLISME DE LA CORAMINE : ESSAI A L'UREASE - SPECTRE U.V. N° 7



Il apparaît ainsi, que la méthode bidimensionnelle donne de bien meilleurs résultats pour la séparation des divers métabolites contenus dans l'urine. Cependant, l'examen du chromatogramme sous U.V. n'a permis de localiser que le spot de CNO dans l'urine, tandis que le réactif iodobismuthique révélait à la fois Coramine et CNO dans l'urine.

L'élution du spot de CNO dans l'urine, sur le deuxième chromatogramme, suivie de l'enregistrement du spectre U.V., a donné (spectre U.V. N°7):

- un maximum d'absorption à 255-256 nm
(théorique = 259 nm)
- un minimum à 239-241 nm
(théorique = 235 nm pour CNO témoin).

Comme à l'accoutumée, l'urine semble freiner la migration des principes actifs qu'elle renferme, c'est pourquoi, dans la traînée d'urine, il faut rechercher Coramine et CNO, un peu plus bas que les témoins correspondants. De plus, malgré la séparation bidimensionnelle, le spot de CNO élué n'est pas tout à fait pur, puisque son spectre U.V. présente un léger décalage des longueurs d'onde par rapport au spectre de référence.

Afin de vérifier si l'uréase ne risquait pas d'hydrolyser le groupement amide de la Coramine, nous avons procédé à une nouvelle chromatographie sur papier, mais dans une seule dimension, avec le même solvant à base de butanol saturé d'eau et d'acide acétique (60:1). Les résultats sont les suivants (cf. figure 11) :

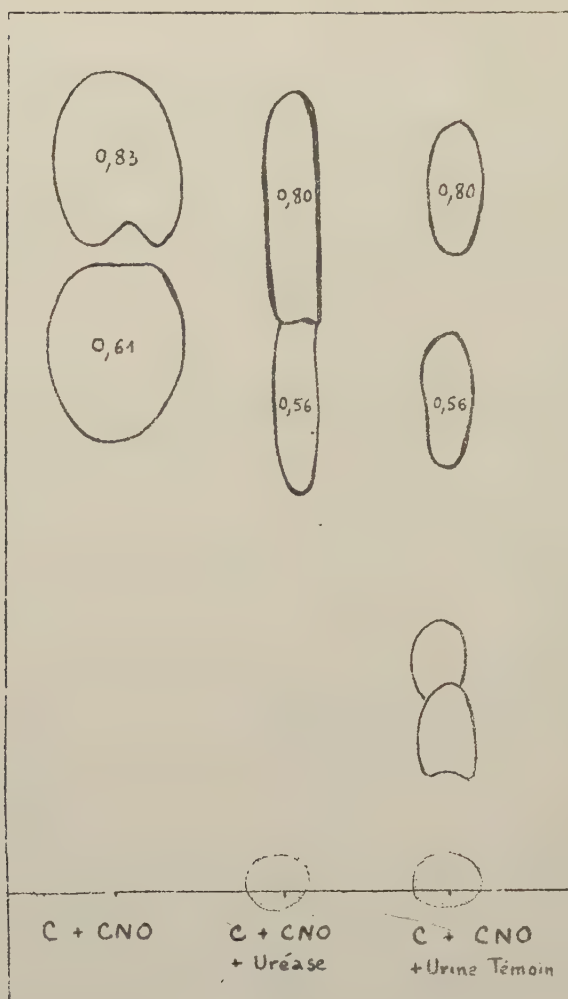


Figure 11

- Coramine (50 μ g) et CNO (50 μ g) : Rf 0,83 et 0,61.
- Coramine (50 μ g) et CNO (50 μ g) et urine témoin concentrée (10 μ l) : Rf 0,80 et Rf 0,56. On note donc une diminution des Rf, qui de plus s'accompagne d'une importante régression de la taille des spots (de moitié) due à une migration en traînée avec un résidu assez important au point de départ
- Coramine (50 μ g) et CNO (50 μ g) et uréase à 1 % en tampon phosphate, traités à 37° C selon le protocole défini précédemment. Les Rf obtenus sont 0,80 et 0,56 comme ci-dessus. Mais on ne perçoit la séparation des deux spots que sous lumière U.V., le réactif de DRAGENDORFF donnant une traînée orange, reliant les 2 spots dont l'intensité est diminuée de moitié par rapport aux témoins.

Tout se passe comme si l'uréase avait partiellement hydrolysé ou même adsorbé la Coramine et son N-Oxyde.

En conclusion, nous aboutissons aux mêmes insatisfactions en ce qui concerne l'action de l'uréase sur les urines contenant de la Coramine ou de la nicotinamide et leurs dérivés N-Oxydes. Il nous semble donc préférable dorénavant de purifier l'urine simplement par traitement progressif avec l'éthanol de titre croissant, conduisant à l'obtention d'un "extractif alcoolique" et d'une solution aqueuse des "résidus hydrosolubles", comme dans le cas des urines des cobayes traités par la nicotinamide.

A) Premier essai de métabolisme de la Coramine :

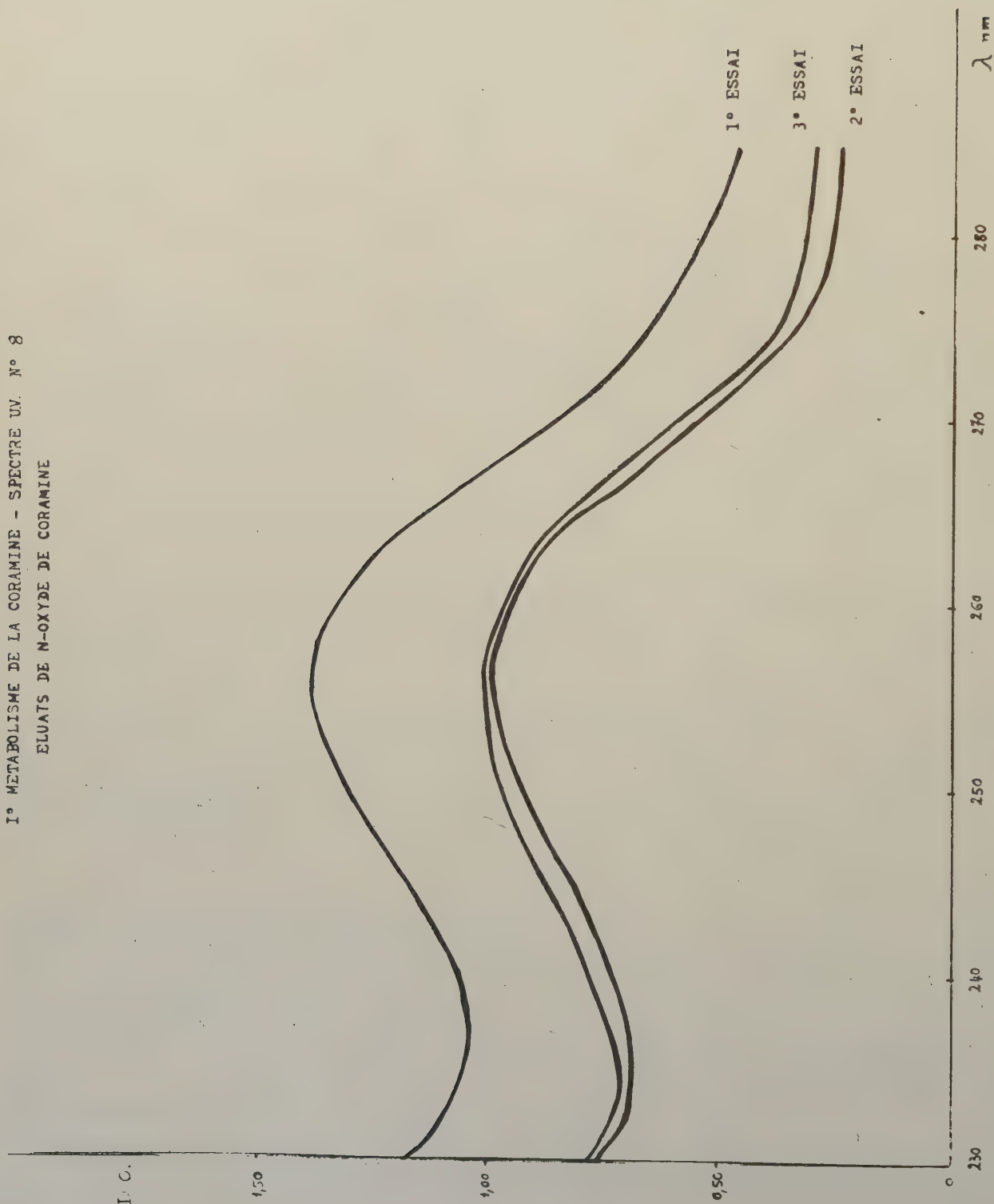
Nous avons d'abord essayé de déterminer la dose la plus forte supportée par le cobaye. En nous référant à l'ouvrage de SPECTOR (1956), nous avons relevé une dose létale absolue de 250 mg/kg, par voie intra-péritonéale, chez le cobaye. Ceci nous a conduit à adopter une dose de 40 mg de Coramine par voie orale, mélangée à de l'eau sucrée, en une seule prise, pour des cobayes dont le poids moyen se situait entre 450 et 500 g.

Les symptômes chez l'animal, sont une forte tachycardie accompagnée d'hyperexcitabilité, suivie d'abattement, et enfin un retour à la normale.

Comme précédemment, nous avons recueilli les urines pendant 24 heures sur de la glace. Bénéficiant de nos premières expériences sur les urines après traitement par la nicotinamide, et dans le but de rendre notre travail quantitatif, nous avons, après évaporation de "l'extractif alcoolique", repris le résidu par 1 ml exactement mesuré, d'éthanol au demi. Cette solution limpide et jaune-pâle, nous a servi pour diverses chromatographies sur papier simple avec le solvant : butanol saturé d'eau et acide acétique (60:1), ou sur papier sulfaté avec le solvant à base de sulfate d'ammonium à 1 % et d'alcool isopropylique (1:2). Toutes ces chromatographies étaient bidimensionnelles, certaines en double exemplaire, afin de mieux localiser les spots correspondant à CNO.

L'élution par l'eau distillée chaude, de ces spots, apparaissant en violet foncé lorsqu'on examine les chromatogrammes sous lumière U.V.

I^o METABOLISME DE LA CORAMINE - SPECTRE UV. N° 8
ELUATS DE N-OXYDE DE CORAMINE



à 254 nm, au même niveau (ou légèrement plus bas) que le spot témoin de CNO, donne les caractéristiques suivantes de leur spectre U.V. :

= 1er essai en solvant butanol saturé d'eau-acide acétique (60:1) ou "601" :

Maximum d'absorption à 256 nm (au lieu de 259 nm);

Minimum à 236 nm (au lieu de 235 nm);

Δ D.O. = 0,58 pour un dépôt de 50 μ l, élué par 6 ml d'eau, ce qui correspond à 2,76 mg de CNO pour l'ensemble de l'extractif alcoolique.

= 2ème essai avec le même solvant "601" :

Maximum d'absorption à 257 nm (au lieu de 259 nm);

Minimum à 234-235 nm (au lieu de 235 nm);

Δ D.O. = 0,52 pour un dépôt de 100 μ l, élué par 15 ml d'eau, ce qui correspond à 3,09 mg de CNO pour l'ensemble de l'extractif alcoolique.

Ce deuxième résultat, légèrement plus fort, que le premier est dû sans doute à une durée d'élution supérieure (qui n'a pas été mesurée).

= 3ème essai avec le solvant à base de sulfate d'ammonium à 1 % et d'alcool isopropylique (1:2) :

Maximum d'absorption à 256 nm (au lieu de 259 nm);

Minimum à 234 nm (au lieu de 235 nm);

Δ D.O. = 0,53 pour un dépôt de 100 μ l d'extractif alcoolique, élué par 15 ml d'eau; ce qui correspond à 3,1 mg de CNO pour la totalité de cet extractif alcoolique.

De l'ensemble de ces résultats se dégage un chiffre moyen d'élimination urinaire de 3 mg de Coramine-N-Oxyde en 24 heures, après administration orale d'une dose de 40 mg de Coramine, ce qui représente donc 7,5 % de la dose ingérée.

En ce qui concerne la solution aqueuse des "résidus hydrosolubles", elle a été examinée en chromatographie bidimensionnelle, avec le dernier système solvant mentionné, à base de sulfate d'ammonium et d'acool isopropylique, sur papier sulfaté. L'élution d'un spot, présumé comme étant du CNO, a donné un spectre dans l'ultra-violet sans aucune caractéristique de maximum d'absorption. On en conclut que ce résidu hydrosoluble ne renfermait pas de N-Oxyde de Coramine.

En ce qui concerne la recherche de la Coramine elle-même sur ces chromatographies, nos différents ~~essais~~ se sont tous révélés négatifs.

B) Deuxième essai de métabolisme de la Coramine :

Nous avons repris les mêmes conditions expérimentales que dans le premier essai. C'est à dire que les urines de cobaye, recueillies pendant 24 heures sur glace et filtrées, après traitement de l'animal par une seule prise orale de 40 mg de Coramine, ont été concentrées par évaporation sous vide, puis traitées par de l'alcool éthylique de titre croissant, ce qui nous a permis d'obtenir finalement :

a) un "extractif alcoolique" en solution dans 2 ml exactement d'éthanol au demi;

b) une solution aqueuse des "résidus hydrosolubles", que l'on a divisé en deux parties égales :

b₁ - la première, simplement concentrée par évaporation sous vide, est reprise par 2 ml d'eau distillée chaude.

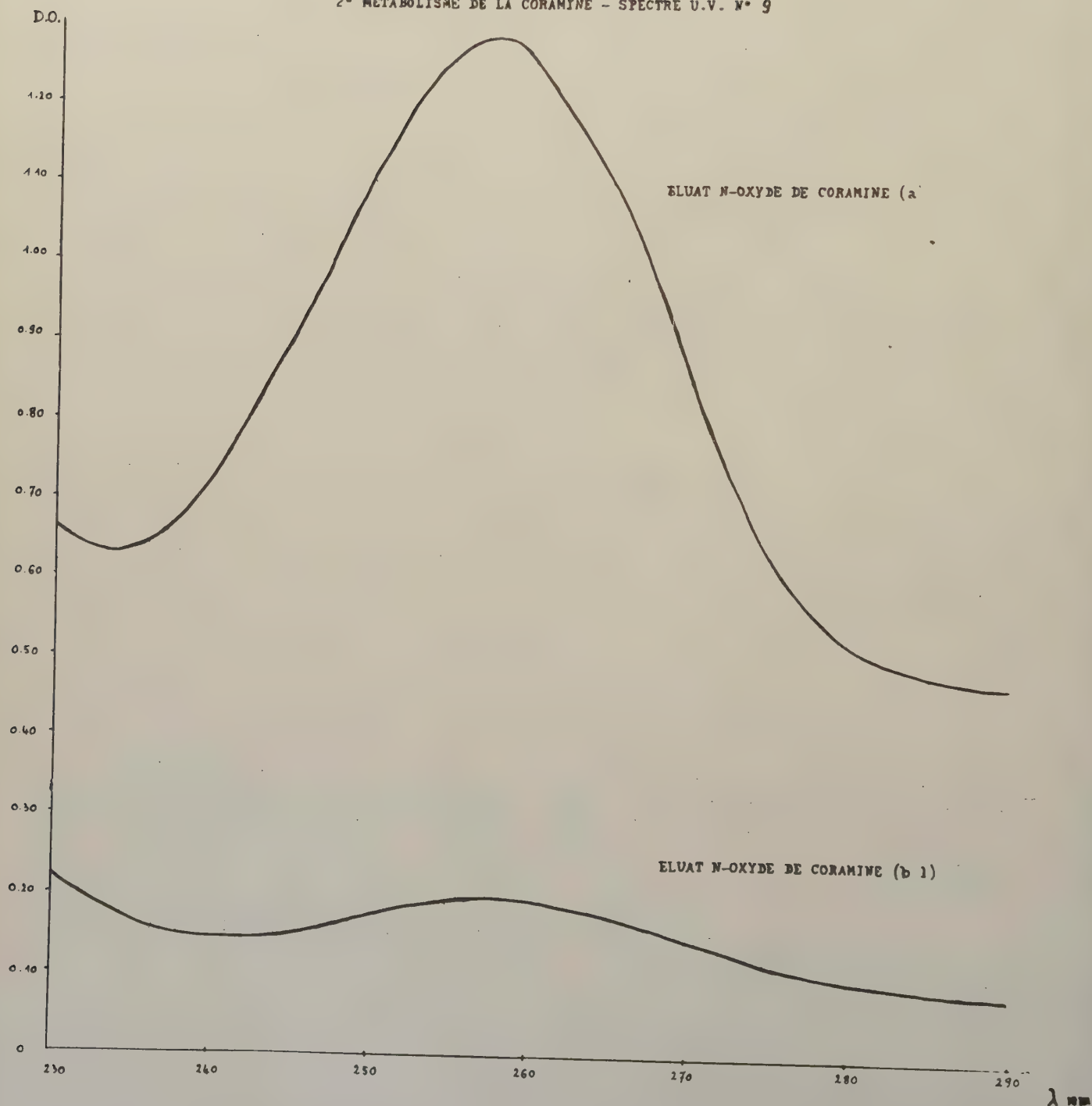
b₂ - la seconde, traitée par HCl concentré, à pH = 1, est portée au bain de sable à 100-110° C, 1 h.30, afin d'hydrolyser d'éventuelles formes conjuguées labiles, puis reprise après évaporation à sec comme ci-dessus par 2 ml d'eau distillée chaude.

L'étude chromatographique dans les deux systèmes solvants précédemment mentionnés, selon la technique bidimensionnelle sur papier, suivie de l'élution des spots (repérés sous lumière U.V.) dans l'eau distillée, puis de l'enregistrement du spectre ultra-violet, nous a donné les résultats ci-après :

- pour l'extractif alcoolique : longueur d'onde maximale d'absorption à 257 nm (au lieu de 259 nm pour CNO témoin) et minimale à 234 nm (au lieu de 235 nm).

Le spot élué migrait au même niveau que CNO témoin, dans les deux systèmes solvants :

2° METABOLISME DE LA CORAMINE - SPECTRE U.V. N° 9



= en solvant "601", $R_f = 0,66$ et $R_f = 0,59$ pour CNO, dans les deux dimensions successives; tandis que la Coramine migre à $R_f=0,87$ et $R_f=0,82$ dans les mêmes conditions.

= en solvant à base de sulfate d'ammonium et d'alcool isopropylique: $R_f=0,87$ et $R_f=0,84$ pour CNO; et $R_f=0,97$ et $0,94$ pour la Coramine.

On note pour cet extractif alcoolique une Δ D.O. = $0,76$ pour un dépôt de $100 \mu l$, élué par $5 ml$ d'eau distillée, ce qui correspond à une concentration finale de $3,02 mg$ de CNO pour la totalité de l'extractif alcoolique (cf. Eluat N-Oxyde de Coramine (a), Spectre U.V. N° 9).

En opérant dans les mêmes conditions sur ces chromatogrammes, il n'a pas pu être mis en évidence de Coramine.

- pour la solution aqueuse des résidus hydrosolubles :

En ce qui concerne la fraction b_1 , non hydrolysée, nous avons obtenu des résultats différents suivant que la chromatographie sur papier était réalisée selon la technique "pointillée" ou bidimensionnelle. Dans le premier cas, nous n'avons pas pu mettre en évidence de CNO. Dans le second cas, par contre, le spectre U.V. de l'éluat donne :

= un maximum à $257-259 nm$ (théorique $259 nm$)

= un minimum à $240-242 nm$ (théorique $235 nm$)

mais la courbe est assez "plate" (le pic est peu accusé), ce qui entraîne une erreur importante sur la mesure de Δ D.O. En effet, nous lisons Δ D.O. = $0,085$ pour un dépôt de $100 \mu l$, élué par $4 ml$ d'eau distillée, ce qui correspond à $0,54 mg$ de CNO pour la totalité de la solution aqueuse du résidu hydrosoluble. (cf. Eluat N-Oxyde de Coramine (b_1), Spectre U.V. N° 9). La recherche de Coramine s'est encore révélée négative dans ce cas.

Pour la fraction b_2 , hydrolysée par HCl , nous n'avons pas pu mettre en évidence de Coramine ni de CNO, ce qui élimine l'hypothèse concernant la possibilité d'existence de métabolites conjugués de la Coramine ou du Coramine N-Oxyde.

V - CONCLUSION

A l'issue de divers essais métaboliques réalisés chez le cobaye, après administration orale de 40 mg de Coramine chaque fois, nous observons une élimination urinaire de 1,79 mg à 3,56 mg de N-Oxyde de Coramine par 24 heures, ce qui représente au minimum 4,5 %, et au maximum 8,9 % de la dose ingérée par l'animal. Par contre nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la présence de Coramine inchangée dans l'urine.

Quatrième Chapitre

PYRIBENZAMINE

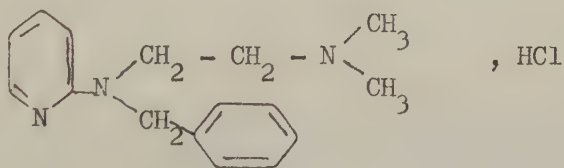
Première Partie

TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA PYRIBENZAMINE

I - INTRODUCTION

La Pyribenzamine (ou chlorhydrate de tripélennamine) est un anti-histaminique que l'on utilise chez l'homme par voie orale, à raison de 10 à 20 cg par 24 h. Chez la souris, la DL 50, per os, est de 210 mg/kg, et chez le rat, elle est de 535 mg/kg (SPECTOR 1956, MERCK 1960).

Du point de vue chimique, c'est le chlorhydrate de [benzyl-(pyridyl-2) amino] - 1 diméthylamino-2 éthane, et il répond à la formule ci-dessous :



Il nous a paru intéressant d'étudier le métabolisme de cette substance médicamenteuse, dont la molécule - renfermant 3 atomes d'azote, dont un hétérocyclique et deux aminés -, se prêtait bien à l'éventualité d'une N-oxydation dans l'organisme.

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

a) Solubilité et point de fusion :

La Pyribenzamine se présente sous l'aspect d'une poudre blanche, cristalline, faiblement hygroscopique, à goût amer et légèrement anesthésique, F : 189°-192° C (selon le fabricant CIBA), ou F: 182°-184° C (AUTERHOFF 1950) ou F: 192,5°-193,5° C (MERCK 1960).

L'addition d'une solution saturée d'acide picrique, à une solution aqueuse de Pyribenzamine, laisse déposer un précipité de picrate de tripélenamine, qui, après quatre recristallisations dans l'acétone, donne F: 178° C, sans décomposition (PERLMAN 1949). Selon d'autres auteurs, il se formerait également un dipicrate, F: 191,1°-194,8° C (MERCK 1960).

Pour dissoudre 1 g de chlorhydrate de tripélenamine, il suffit de 0,77 ml d'eau ou de 6 ml d'éthanol ou de chloroforme, ou 350 ml d'acétone; par contre, il est pratiquement insoluble dans le benzène, l'éther et l'acétate d'éthyle.

La base correspondante, est préparée par alcalinisation d'une solution aqueuse de chlorhydrate de tripélenamine, que l'on extrait par le dichloroéthane (KAGAN 1957), ou l'éther ou encore le chloroforme. Il s'agit d'un liquide huileux, à odeur aminée, Eb : 167°-172° C, et qui est partiellement miscible à l'eau (MERCK 1960) ce qui permet son entraînement par la vapeur d'eau (AUTERHOFF 1950).

Sous l'action prolongée de l'eau oxygénée à 100 volumes (30 %) en milieu éthanolique, pendant cinq jours, on transforme la base en N-Oxyde de pyribenzamine, dont on élimine l'eau oxygénée en excès, par l'oxyde de platine. Ce N-Oxyde se présente sous l'aspect d'un produit huileux, que l'on ne parvient à faire cristalliser qu'après plusieurs jours, sous un vide poussé. Les cristaux obtenus sont très hygroscopiques : en tube scellé ils donnent F: 100°-103° C. On peut préparer un dipicrate (F: 163,5°-166° C) et un dibromhydrate (F: 185°-186° C).

Le N-Oxyde de Pyribenzamine fut synthétisé par KAGAN (1957) en vue de son application possible comme antihistaminique. Sa préparation a fait l'objet d'un brevet.

b) Spectre Ultra-Violet :

Suivant le solvant et selon le pH, les caractéristiques spectrales sont un peu différentes. Nous avons regroupé ci-dessous les divers renseignements obtenus :

Solvants	λ min. en nm	λ max. en nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	λ min. en nm	λ max en nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	Auteurs
HCl dilué, pH=0,1	219	239 (474)	263	314 (276)	KLECKNER (1955)
H ₂ SO ₄ (0,1 N)		238 (480)	263	313 (280)	SUNSHINE (1963)
HCl dilué, pH=2,0	219	239 (482)	262	314 (277)	KLECKNER (1955)
Tampon acétate M/15 pH = 3,6		238 (490)	270	309 (245)	PERLMAN (1949)
HCl dilué, pH=4,1	220	242 (484)	271	309 (203)	KLECKNER (1955)
HCl dilué, pH=5,7	221	245 (489)	271	306 (164)	KLECKNER (1955)
H ₂ O	221	245 (480 à 500)			MERCK (1960)
H ₂ O		243 à 244			MUNOZ (1953)
Tampon phosphaté M/15 pH = 8		246 (515)	274	307 (172)	PERLMAN (1949)
NaOH (0,1 N)		248 (550)	272	310 (150)	SUNSHINE (1963)
Ethanol	222	246 (547)	273	307 (156)	KLECKNER (1955)

Ce tableau donne à penser que, en fonction de l'élévation du pH, on observe assez régulièrement, à la fois un effet hyperchrome et un déplacement bathochrome, sauf en ce qui concerne le deuxième maximum d'absorption, qui subit le phénomène inverse.

PERLMAN (1949) ayant réalisé le spectre U.V. du chlorhydrate de tripélennamine, à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$, à pH = 3,6 et à pH = 8, a constaté l'existence de deux points isosbestiques à 230 nm et 275 nm, c'est à dire deux points d'intersection des courbes, où la densité optique est égale malgré la différence de pH.

c) Spectre Infra-Rouge :

En 1965, THOMPSON réalisa le spectre I.R. de la Pyribenzamine à l'état solide, utilisant du Nujol comme excipient, de préférence à du bromure de potassium, qui, selon lui, amène des interactions ioniques et un écrasement des cristaux. Il trouve un pic d'absorption important à 2630 cm^{-1} , correspondant à la vibration de valence $\text{N}^+\text{-H}$, des sels d'amines tertiaires. Si le degré d'hydratation de la molécule s'accroît, de même le nombre d'onde du pic augmente. L'auteur note un deuxième pic important à 2500 cm^{-1} (THOMPSON 1965).

d) Séparation chromatographique :

La migration du chlorhydrate de tripélennamine a été étudiée dans différents systèmes :

1) Chromatographie sur papier

Cette méthode semble avoir été assez peu utilisée :

- HUEBNER (1951) emploie soit le système : ammoniacque à 1 % saturée d'alcool amylique, qui donne un R_f de 0,72,
soit le système : pyridine à 1 % dans l'eau saturée d'alcool benzylique, qui donne un R_f de 0,30.
- BARUFFINI (1958) utilise le classique mélange : butanol-acide acétique-eau (4:1:5), le mélange solvant : butanol-acide chlorhydrique 0,5 N (9:3), ou bien encore le système : isopropanol-acide chlorhydrique 0,5 N (9:3).
- WEINMAN (1959) se sert du solvant butanol-acide acétique-eau (100:14:38), qui donne un R_f de 0,80.
- Enfin, plus récemment, VECERKOVA (1962) a fait migrer la tripélennamine-base sur du papier imprégné de pétrole, dans des solvants contenant 2 % d'ammoniacque mélangé à des proportions variables d'éthanol et d'eau.

Lorsque le pourcentage d'éthanol passe de 55 % à 95 %, en réalisant une migration de vingt heures par voie ascendante, le Rf varie de 0,43 à 0,75. Cette augmentation des Rf s'explique par la diminution de polarité du solvant et l'accroissement parallèle de la solubilité de la base.

2) Chromatographie sur couches minces :

Ce type de chromatographie a été très utilisé, car il offre les avantages de la rapidité (de 30 mn à 2 h de migration suivant les cas) et de la sensibilité (détection de 5 à 10 μ g dans 5 à 10 μ l).

COCHIN (1962), travaillant sur couches minces d'alumine G, a obtenu des Rf assez élevés. Ainsi avec le mélange butanol-éther butylique-acide acétique (4:5:1), le chlorhydrate de tripélenamine donne un Rf de 0,76. Mais il a également employé le Silicagel G, parfois en chromatographie bidimensionnelle. Ainsi, avec les mélanges-solvants suivants: méthanol-butanol-benzène-eau (12:3:2:3), le Rf est de 0,28 et avec l'éthanol-acide acétique-eau (12:6:2) le Rf est de 0,46.

Avec le Silicagel G, TATSUTOYO (1965) emploie le solvant chloroforme-méthanol-ammoniaque (98:1:1); tandis que FIKE (1965 et 1966) et SUNSHINE (1966) jouent à la fois sur la méthode de mise en suspension de la silice, qu'ils préparent avec divers solvants (comme l'eau, la soude 0,1 M, le sulfate monopotassique 0,1 M, le sulfate monosodique 0,1 M, la potasse 0,1 M), et sur la composition du mélange-solvant (souvent à base de méthanol ou d'éthanol) pour obtenir des Rf différents.

Ainsi avec le méthanol comme solvant de migration, et sur Silicagel préparé soit avec de la soude 0,1 M soit avec du sulfate monopotassique 0,1 M, le Rf passe de 0,35 à 0,12.

3) Chromatographie en phase gazeuse :

CELESTE (1966) a proposé d'identifier la Pyribenzamine en solution aqueuse, en l'injectant dans une colonne garnie de Carbowax 20M SE-30, chauffée à 185° C (c'est-à-dire aux alentours de la température de fusion) avec l'azote comme gaz vecteur. L'auteur emploie un détecteur à ionisation

de flamme d'hydrogène, et obtient des rendements variant entre 96,9 et 102,5 %, ce qui confirme l'assez bonne spécificité de la méthode, et la stabilité thermique de la molécule de Pyribenzamine.

e) Caractérisation

Diverses réactions chimiques ont pu être mises en jeu.

En 1950, AUTERHOFF a passé en revue l'action de réactifs généraux s'appliquant habituellement à la caractérisation des alcaloïdes. Avec le chlorhydrate de tripélenamine il obtint notamment :

- un précipité blanc-jaunâtre avec le tannin, l'acide phosphomolybdique, l'iode diluée, le réactif de Nessler;
- un précipité brun avec le perchlorure de fer dilué, l'acide sulfurique concentré et le réactif de Mandelin;
- une coloration jaune avec l'acide nitrique fumant.
- avec le réactif de FROEHDE il obtient une coloration verte, lente à apparaître;
- avec le réactif de MARQUIS, une coloration brun-rouge.

L'auteur signale comme caractéristique la réaction donnée par la Pyribenzamine avec la chloramine chauffée en milieu chlorhydrique. Après refroidissement et alcalinisation par l'ammoniaque, il obtient une coloration jaune puis verte, sensible à 1 mg de produit, ce qui la rend pratiquement inapplicable sur un chromatogramme.

HUEBNER (1951) a recours à la réaction au bromure de cyanogène et à la benzidine (caractéristique du noyau pyridinique) pour révéler la Pyribenzamine en chromatographie sur papier : elle se manifeste par une vive fluorescence sous lumière ultra-violette.

Nous signalerons également la révélation des spots de Pyribenzamine par des réactifs généraux, tels que la solution iodoplatinique (COCHIN 1962), la solution alcoolique d'iode, les réactifs de DRAGENDORFF et de MANDELIN (FIKE 1965 et 1966, SUNSHINE 1966).

f) Méthodes de dosage

Quatre méthodes ont été employées :

La plus ancienne est la méthode de BRODIE (1945 & 1947) qu'utilise WAY (1950) pour doser le chlorhydrate de tripélenamine dans les urines, chez l'homme et dans les divers organes, chez le rat ou le cobaye. Elle repose sur l'extraction, en milieu alcalin, de la tripélenamine-base, par le dichloro-éthane ou le benzène, suivie de sa combinaison avec un colorant sulfonique, le méthyl-orange. Ce composé passe alors en phase organique dont on l'extraît par acidification; le méthyl-orange libéré dans la phase aqueuse se prête alors à un dosage photométrique à 515 nm.

En 1949 JONES, ainsi que PERLMAN, mirent à profit la réaction de fixation du bromure de cyanogène sur le noyau pyridinique, méthode mise au point par : en 1904.

JONES opère en milieu tamponné par du phthalate acide de potassium et termine sa réaction par addition d'aniline : il obtient une coloration jaune, photométrable entre 400 et 465 nm, pour des concentrations variant entre 100 et 900 μg dans la prise d'essai.

PERLMAN (1949) en faisant réagir sur la Pyribenzamine, du bromure de cyanogène en présence de tampon phosphaté à pH 6,6, obtient une fluorescence bleue. La longueur d'onde excitatrice est à 370 nm et celle émise est lue à 460 nm. Cette fluorescence est inhibée par les réducteurs comme l'hydrosulfite de sodium, et restituée par les oxydants comme l'eau oxygénée par exemple. Elle semble être caractéristique des composés ayant une substitution azotée en α de l'azote pyridinique.

On a proposé également une méthode employant des molécules de Pyribenzamine, marquées au ^{14}C sur le carbone vicinal du radical benzylique, ce qui permet de suivre leur devenir dans l'organisme, après injection à l'animal (WEINMAN 1958).

Il existe encore une méthode de titrimétrie en milieu non aqueux; celle-ci est applicable à une solution acétonique de Pyribenzamine, que l'on dose par l'acide perchlorique en solution dans le dioxane, en présence d'un rouge de méthyle comme indicateur (CHATTEN 1961). Toutefois cette méthode, destinée au dosage dans les médicaments, manque de sensibilité et s'applique difficilement à des métabolites, dont les concentrations sont souvent très minimes.

III - ETUDE DU METABOLISME DE LA PYRIBENZAMINE

1) Extraction et séparation des métabolites à partir des divers milieux biologiques

a) à partir de l'urine

PERLMAN (1949) traite l'urine en milieu alcalin et à chaud, puis l'extrait par le benzène. La phase benzénique est lavée par l'acide chlorhydrique, puis amenée à pH 6,6 par du tampon phosphate M/15.

WAY (1950) opère de façon analogue, mais emploie un tampon phosphate 0,5 M à pH 7, pour purifier son premier extractif benzénique.

WEINMAN (1959) réalise diverses extractions successives, assez complexes, d'abord par le chloroforme en milieu acide, puis alcalin, puis par le butanol acide.

COCHIN (1962) s'inspirant des premiers travaux de BRODIE (1947) extrait l'urine à pH 9, par du dichloréthane renfermant 10 % d'alcool isoamylique, puis concentre la phase organique à un faible volume, par évaporation sous vide.

Enfin, lorsque l'on soupçonne la présence de conjugués glycuroniques, on a d'abord recours au traitement de l'urine par hydrolyse chlorhydrique à chaud (COCHIN 1962), ou par hydrolyse en milieu alcalin, ou enfin par voie enzymatique en présence de glycuronidase (WEINMAN 1959).

b) à partir des viscères

La méthode de WAY (1950) convient également aux broyats d'organes, tels que cerveau, poumon, foie, reins, rate, coeur et muscle. De même la méthode de WEINMAN (1958) a été appliquée à des tranches de foie, obtenues à partir de cobayes traités à la Pyribenzamine, puis sacrifiés.

2) Comparaison des résultats obtenus par les différents auteurs

METHODES DE DOSAGE	SUJET D'EXPERIENCE	QUANTITE ADMINISTREE	EXCRETION URINAIRE/24 H	AUTEURS
Colorimétrie (Méthode de Brodie)	Homme	400 mg (per os)	15,8-25,5 %	MC GAVACK (1948)
Colorimétrie (Bromure de cyanogène + aniline)	Homme	100 mg (per os)	supérieure à 85 %	JONES (1949)
Fluorimétrie (Bromure de cyanogène à pH 6,6)	Homme	50 à 100 mg (per os)	6 à 11 %	PERLMAN (1949)
Colorimétrie (Méthode de Brodie)	Homme	50 à 100 mg (per os)	< 1% sans hydrolyse 8% avec hydrolyse	WAY (1950)
Colorimétrie (Méthode de Brodie)	Rat ou cobaye	100 mg/kg (I.P.)	inférieure à 2 %	WAY (1950)
Radioactivité	Cobaye	8 mg/kg (I.P.)	90% de la radio- activité administrée	WEINMAN (1958)

Les données les plus récentes sur le métabolisme de la Pyribenzamine sont celles de WEINMAN (1958) qui a travaillé sur le cobaye, avec du chlorhydrate de tripélennamine marqué au carbone ^{14}C , sur le groupement méthylénique vicinal du noyau benzénique. Les cobayes reçoivent 8 mg de ce composé, par kilog de poids corporel, en une seule injection intra-péritonéale. La radio-activité de l'urine est notée en fonction du temps :

en 4 h,	20 à 30 %	du carbone ¹⁴	administré,	se retrouvent	dans l'urine
en 12 h,	70 %	"	"	"	"
en 24 h,	80 %	"	"	"	"
en 72 h,	97 %	"	"	"	"

Certains animaux sont sacrifiés 1 h après l'injection, afin de mesurer la répartition de la radioactivité dans l'organisme :

urine : 16,9 %
contenu intestinal : 23,5 %
foie : 7,8 %
bile : 3,2 %
poumon : 2,1 %

Il semble, d'après cela, que le cycle d'élimination de cette drogue comporte le passage dans la bile et la réabsorption intestinale, mais finalement la presque totalité de la radioactivité administrée est éliminée par voie urinaire en 24 h. Il n'y a donc pas de stockage dans les tissus.

L'auteur a réalisé la séparation des constituants sur l'urine de 24 h à l'aide de plusieurs solvants :

- le chloroforme en milieu acide extrait 0,5 % de la radioactivité par rapport à la totalité du carbone radioactif excrété.
- le chloroforme en milieu alcalin extrait 7 % de la radioactivité.
- le butanol extrait de la solution aqueuse alcaline, saturée de chlorure de sodium, 67 % du ¹⁴C total de l'urine. De cette phase organique, acidifiée ultérieurement par HCl, l'éther de pétrole n'enlève que 1 % de la radioactivité, tandis que 66 % demeurent dans la phase butanolique, que l'auteur appelle "fraction butanol acide".
- quant à la phase aqueuse restante, elle contient 25 % de la radioactivité.

WEINMAN (1958) obtient donc trois liqueurs extractives principales :

- une fraction dite "butanol acide" qui correspond à 66 % de la radioactivité.
- une fraction dite "aqueuse résiduelle" qui correspond à 25 % de la radioactivité.
- une fraction dite "chloroforme basique" qui correspond à 7 % de la radioactivité.

Ces trois fractions comprennent respectivement des composés amphotères, hydrophiles et lipophiles.

La possibilité d'une glycuco-conjugaison ayant été envisagée, l'hydrolyse de la fraction dite "butanol-acide" a été réalisée par voie enzymatique, au moyen de la β -glycuronidase, ou par voie chimique, par chauffage en milieu acide (pH inférieur à 2) ou alcalin (pH supérieur à 10).

Les produits d'hydrolyse se partagent entre le chloroforme acide et le chloroforme alcalin, qui retiennent respectivement 28,8 et 35,5 % de la radioactivité initialement présente dans la fraction "butanol acide".

En ce qui concerne le contenu de la fraction extractible par le chloroforme acide, il vient à l'esprit une hypothèse selon laquelle, la perte du caractère fortement basique de la tripélenamine dans ce métabolite, serait imputable à l'altération du chaînon diméthylaminé. Le spectre U.V. indique que le groupement benzyldiméthylamine, quoique présent, semble avoir subi des modifications.

L'étude chromatographique, sur papier, en solvant butanol-acide acétique-eau (100:14:38) indique que :

- | | | | | |
|---|---|---|---|-------------|
| - le chlorhydrate de tripélenamine témoin migre à Rf 0,80 | | | | |
| - l'urine brute contient le maximum de radioactivité dans le spot Rf 0,40 | | | | |
| - la fraction dite "butanol-acide" | " | " | " | 0,35 |
| - l'extrait "chloroforme-acide"
(après hydrolyse du "Butanol-acide") | " | " | " | 0,85 |
| - l'extrait "chloroforme-alcalin"
(après hydrolyse du "Butanol-acide") | " | " | " | 0,50 à 0,90 |
| - la fraction dite "chloroforme basique" | " | " | " | 0,80 |

Devant ces résultats, l'auteur avait pensé que la fraction "chloroforme basique" pourrait correspondre à la Pyribenzamine; or il n'en est rien car le comportement électrophorétique des deux substances révèle qu'elles sont de nature différente.

WEINMAN (1959) se rapportant alors aux travaux antérieurs de PERLMAN (1949) selon lesquels 10 % de Pyribenzamine sont éliminés, sous forme **conjuguée**, hydrolysable par chauffage de l'urine en milieu alcalin, pense qu'il s'agit de N-méthyl-tripélenamine. En effet ce composé pourrait fort bien libérer de la tripélenamine par hydrolyse, et donner une réaction de fluorescence avec le bromure de cyanogène, un spectre U.V., un point de fusion et une activité antihistaminique identiques au produit de départ.

§

IV - CONCLUSION

Finalement, aucun des métabolites n'est identifiable à de la Pyribenzamine. De plus, leur activité antihistaminique est inférieure. Il semble que la forme d'élimination la plus importante soit glycuconjuguée (pour les 2/3 environ), après hydroxylation de la molécule en divers points, ce qui justifierait les différences de Rf observées.

Deuxième Partie

TRAVAUX PERSONNELS SUR LA

PYRIBENZAMINE

Nous avons vu antérieurement l'intérêt thérapeutique comme antihistaminique de la Pyribenzamine (chlorhydrate de tripélennamine) et il nous a paru que, parmi ses métabolites, la recherche d'un dérivé N-Oxyde, non étudié jusqu'à maintenant, justifiait une étude plus approfondie. Celle-ci devant s'appuyer sur la mise au point des caractéristiques du dérivé préparé par synthèse, notre premier travail fut de le mener à bien.

I - SYNTHÈSE DU N-OXYDE DE PYRIBENZAMINE

Nous inspirant de la méthode utilisée par VON EULER (1958) pour préparer le N-Oxyde de nicotinamide, nous avons procédé comme suit. Dans un premier temps la base fut isolée à partir du chlorhydrate de tripélennamine commercial (Pyribenzamine^{*}) en solution aqueuse, après alcalinisation par l'ammoniaque et extraction par l'éther éthylique.

La base (1 g) fut alors dissoute dans 2 ml d'acide acétique cristallisable, puis additionnée d'eau oxygénée concentrée à 100 volumes (1 ml). Après un séjour de 48 heures dans un bain de sable, chauffé électriquement à 65° C, on élimina l'eau oxygénée en excès par le noir de platine, puis on centrifugea.

La liqueur alcalinisée par l'ammoniaque diluée, à pH = 9, fut épuisée par le chloroforme afin de séparer la base tripélennamine libre, éventuellement présente.

* Nous tenons à remercier les laboratoires CIBA qui nous ont aimablement fourni la Pyribenzamine.

La phase organique, évaporée à sec, ne laissa aucun résidu; donc il ne restait pas de tripélenamine-base libre en excès.

La phase aqueuse, acidifiée par HCl à pH = 1, laisse après évaporation à sec, un résidu de chlorhydrate de tripélenamine-N-Oxyde (par abréviation, nous l'appellerons désormais TPNO). Celui-ci se présente sous forme de cristaux jaune-brun, d'aspect "mousseux" très hygroscopiques : on ne peut les observer à l'état solide qu'en s'aidant d'un vide très poussé, réalisé en présence d'anhydride phosphorique.

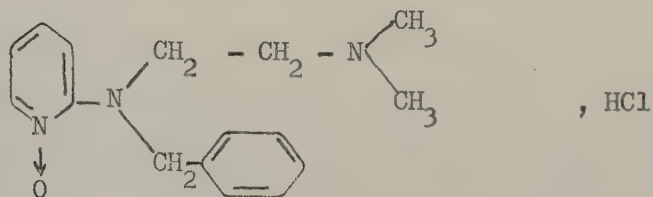
Ces cristaux sont très nettement différents des cristaux de Pyri-benzamine (chlorhydrate de tripélenamine) qui apparaissent sous forme pulvérulente, blanche, très légèrement hygroscopique.

Leur analyse élémentaire fournit les pourcentages suivants des divers éléments :

C % = 52,93 H % = 7,17 N % = 11,88 à 11,90 O % = 11,25 à 11,51

Ils conduisent à la formule brute : $C_{16} H_{25} O_{2,5} N_3 Cl$

ce qui correspondrait au chlorhydrate de tripélenamine-N-Oxyde cristallisant avec 1,5 molécule d'eau. L'étude physico-chimique ultérieure de ce composé nous amène à lui attribuer la formule ci-contre :



II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

a) Points de fusion

Les cristaux de chlorhydrate de TPNO sont identifiés par leur point de fusion en tube scellé, au bain d'huile. On observe la fusion entre 130° et 135° C, alors que le point de fusion instantané du chlorhydrate de tripélenamine se situe entre 187° et 189° C, selon le Codex 1965.

On peut également transformer le chlorhydrate de TPNO en picrate, que l'on fait recristalliser dans l'éthanol. Le point de fusion instantané de ce picrate est trouvé à 166°-167° C, alors que le picrate de tripélenamine fond à 192°-195° C.

b) Solubilités

On peut comparer les solubilités de la Pyribenzamine telles qu'elles sont fournies par le fabricant, avec celles que l'on observe pour le chlorhydrate de TPNO.

La Pyribenzamine (chlorhydrate de tripélenamine) est très soluble dans l'eau; soluble dans le méthanol, l'éthanol, et le chloroforme; peu soluble dans l'acétone; insoluble dans l'éther, le benzène, et l'acétate d'éthyle.

Le N-Oxyde de Pyribenzamine (chlorhydrate de TPNO) est soluble dans l'eau, le méthanol et l'éthanol; très peu soluble dans l'éther, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'alcool amylique, le butanol et l'acétone.

Si l'on traite la solution aqueuse de chlorhydrate de TPNO par de l'ammoniaque diluée, on obtient une solution aqueuse de la base tripélenamine-N-Oxyde, dont les solubilités dans l'eau et dans l'éthanol sont très voisines de celles du chlorhydrate de TPNO.

Nous avons cherché à mieux identifier ces substances, par l'étude de leur spectre U.V. et I.R., que nous commenterons ci-dessous.

c) Spectre Infra-Rouge

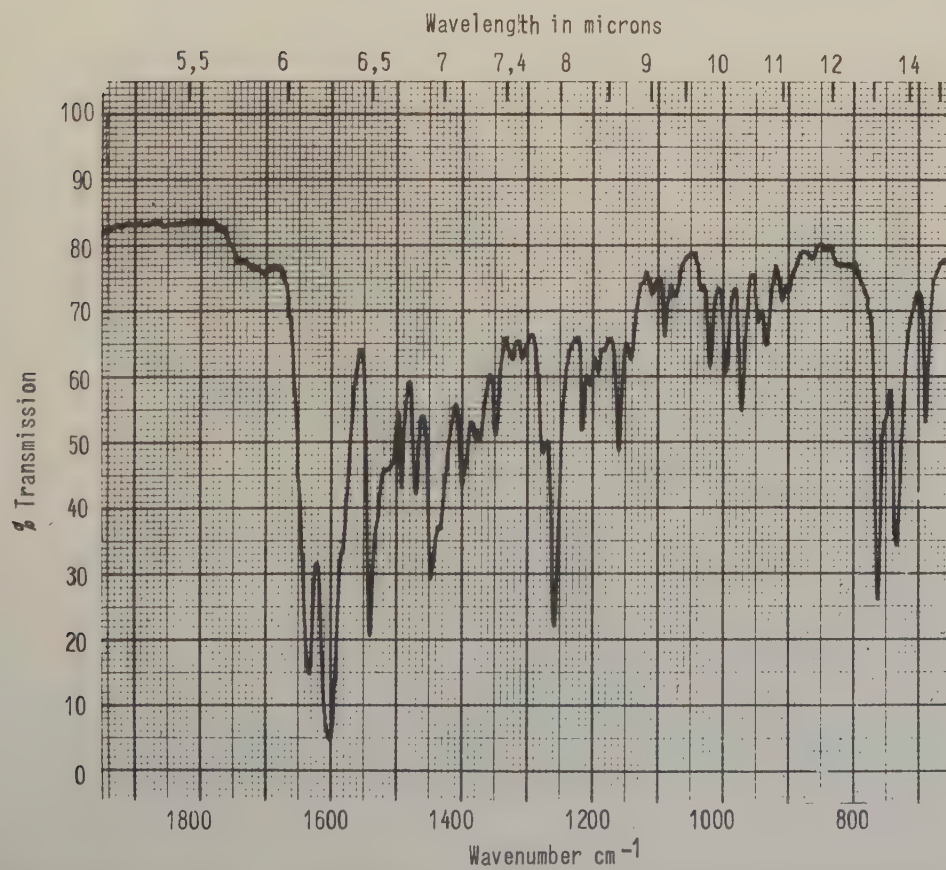
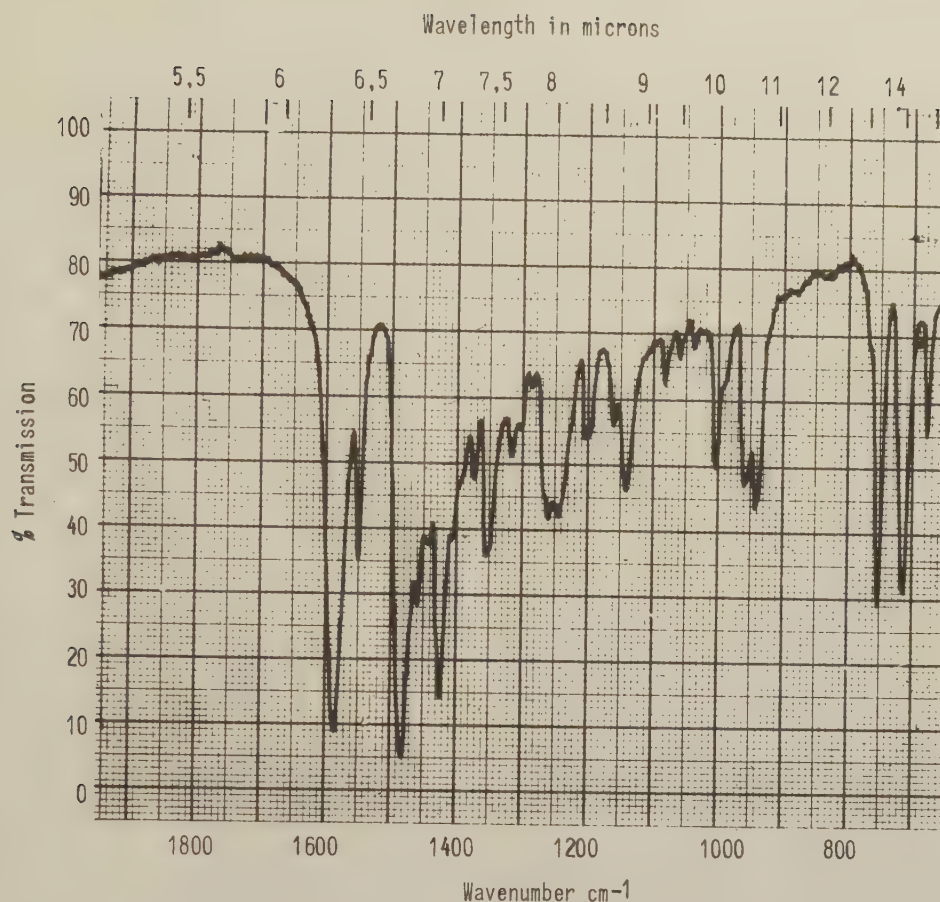
Comme dans les cas précédents, concernant la nicotinamide et la Coramine, nous avons eu recours à la technique du pastillage avec un halogénure alcalin. Nous nous sommes à nouveau borné à la gamme des fréquences s'étalant entre 600 cm^{-1} et 2000 cm^{-1} , pour les raisons précédemment indiquées au chapitre de la nicotinamide.

Nous avons mélangé 1 mg de Pyribenzamine et 313 mg de KBr, pour obtenir le spectre I.R. N° 7; et 1,2 mg de chlorhydrate de TPNO dans 250 mg de KBr, pour le spectre I.R. N° 8.

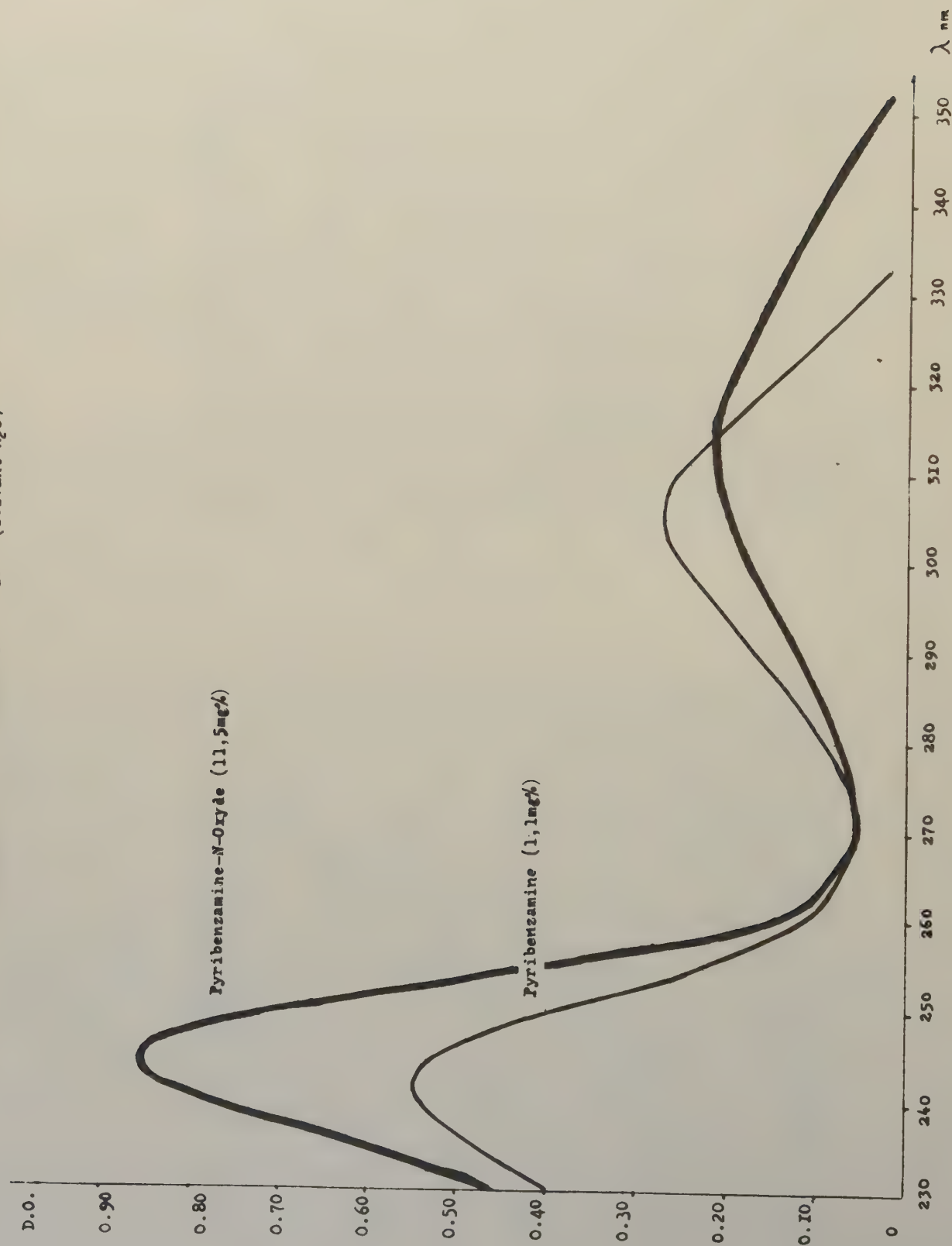
Le spectre I.R. du chlorhydrate de tripélennamine nous montre, à 720 et 750 cm^{-1} , deux bandes dues à la présence de cinq atomes d'hydrogène adjacents et libres sur le cycle benzénique, par déformation hors du plan du noyau. Les vibrations de valence des liaisons C-N et C=C du noyau pyridinique, donnent un pic à 1590 cm^{-1} et un autre vers 1500 cm^{-1} .

Dans le spectre I.R. du chlorhydrate de TPNO, nous retrouvons à peu près les mêmes caractéristiques; mais à 1260 cm^{-1} il apparaît un pic supplémentaire, caractéristique de la liaison oxygène-azote hétérocyclique, tandis que dans la région de 950 à 1000 cm^{-1} où se situe la vibration de valence de la liaison oxygène-azote extra-nucléaire, aucune transformation n'est notée.

Ceci tend à prouver que l'oxygène du TPNO se trouve sur l'atome d'azote pyridinique et non sur l'atome d'azote extra-nucléaire.



SPECTRES U.V. DE REFERENCE - N° 10 - (solvant H₂O)



d) Spectre Ultra-Violet

Nous avons préparé des solutions de Pyribenzamine et de Pyribenzamine-N-Oxyde, dans l'eau, puis dans l'acide chlorhydrique à 1 %. Les caractéristiques essentielles de ces spectres sont les suivantes :

	Pyribenzamine			Pyribenzamine-N-Oxyde		
	$\lambda_{\text{max.}}$	$\lambda_{\text{min.}}$	$\lambda_{\text{max.}}$	$\lambda_{\text{max.}}$	$\lambda_{\text{min.}}$	$\lambda_{\text{max.}}$
Eau	241	270	305 nm	245	270	315 nm
HCl 1 %	240	265	310-316 nm	244	270	318-320 nm

Les courbes de référence, en solution dans l'eau, sont représentées sur le graphique ci-contre. On constate que le coefficient d'extinction de la Pyribenzamine est environ 7 fois supérieur à celui du N-Oxyde :

- Pyribenzamine : $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} (\lambda_{\text{max.}} 241 \text{ nm}) = 500$

- Pyribenzamine N-Oxyde : $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} (\lambda_{\text{max.}} 245 \text{ nm}) = 75$

On observe un léger décalage entre les maxima d'absorption de la Pyribenzamine et de son N-Oxyde, comme précédemment pour la nicotinamide et le Coramine.

Afin de définir les caractéristiques chromatographiques de la Pyribenzamine (chlorhydrate TP) et de son N-Oxyde (chlorhydrate TPNO) nous avons procédé à une série très large d'essais avec des solvants personnels ou utilisés par d'autres auteurs pour diverses molécules organiques azotées.

d) Systèmes chromatographiques utilisés :

- Chromatographie sur papier : nous avons eu recours à une technique ascendante, sur papier Whatman N° 1, simple ou imprégné soit de tampon phosphate de MUNIER (1953), soit de sulfate d'ammonium à 1 %. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Solvant	Papier	Migration		TP, Chte	TPNO, Chte
		Temps	Hauteur		
Butanol saturé d'eau	phosphaté	4 h	(151 mm)	Rf: 0,50	Rf: 0,36
Butanol sat.eau-acide acétique (60:1)	simple	3 h	(125 mm)	0,70	0,57
Alc.isopropylique-sulfate d'ammonium à 1 % (2:1)	sulfaté	3 h	(125 mm)	0,86	0,80
	simple	5 h	(136 mm)	0,92	0,87
Butanol sat.ammoniaque (N)	simple	4 h.30	(147 mm)	0,92	0,57
Acétone-eau (7:3)	simple	4 h	(180 mm)	0,84	0,96
Propanol-eau (8:2)	simple	1 h.15	(79 mm)	0,81	0,76
Chloroforme-méthanol (15:5)	simple	2 h	(176 mm)	0,87	0,79
Butanol-acide formique-eau (77:10:13)	simple	1 h.50	(125 mm)	0,56	0,64
Alcool amylique sat. ammoniaque (N)	simple	7 h	(129 mm)	0,95	0,33
Alcool amylique-pyridine-eau (42:84:74)	simple	5 h	(156 mm)	0,96	0,94
Butanol-pyridine-eau (1:1:1)	simple	5 h	(166 mm)	0,95	0,89
Isopropanol-ammoniaque(N)-eau (20:1:2)	simple	5 h	(153 mm)	0,95	0,68
Butanol-acide acétique-eau (4:1:5)	simple	4 h	(143 mm)	0,73	0,75
Butanol-acide acétique-eau (100:14:38)	simple	4 h	(136 mm)	0,77	0,82
Butanol sat.eau-acide formique (30:7)	simple	2 h.30	(157 mm)	0,62	0,79

De l'ensemble de ces essais, se dégage l'intérêt de quelques solvants, en particulier le butanol saturé d'ammoniaque (N), ou l'alcool amylique saturé d'ammoniaque (N). Ces solvants libérant les bases à partir de leurs chlorhydrates, ceci explique sans doute les meilleures séparations obtenues.

Nous avons retenu tout particulièrement le premier qui nous a donné de bonnes séparations, dans des temps assez courts. Le second, qui fournit des Rf encore plus nettement différenciés, a néanmoins l'inconvénient d'exiger un temps de développement beaucoup plus long.

Au début de nos travaux sur la Pyribenzamine, nous avons souvent employé le solvant à base de butanol saturé d'eau et acide acétique (60:1), car il nous avait donné toute satisfaction pour la nicotinamide et la Coramine, n'exigeant en moyenne que deux heures de migration, tout en fournissant des Rf suffisamment différenciés pour permettre la séparation de la Pyribenzamine et de son N-Oxyde. Ce n'est que plus tard, que nous avons expérimenté les deux solvants alcalins qui nous ont donné de meilleurs résultats.

Nous avons alors entrepris des essais de chromatographie sur couches minces, dont le principal intérêt est une plus grande rapidité de migration.

- Chromatographie sur couches minces

Nous avons utilisé soit des films de silice KODAK K 301 V (recouverts d'un gel de silice avec un liant à base d'alcool polyvinylique), soit des plaques de verre MERCK prêtes à l'emploi, recouvertes de Kieselgel F 254 (c'est-à-dire d'une couche de gel de silice mélangée à un indicateur fluorescent à 254 nm).

Les résultats de nos essais sont regroupés ici :

	Rf (et migration) Chte.TP		Rf (et migration) Chte.TPNO	
	Silice KODAK	Silice MERCK	Silice KODAK	Silice MERCK
Isopropanol-ammoniaque (N)-eau (20:1:2)	0,48 (35 mm/50 mn)	0,21 (52 mm/50 mn)	0,43 (35 mm/50 mn)	0,17 (52 mm/50 mn)
Méthanol-ammoniaque conc. (99:1)	0,46 (82 mm/50 mn)	0,34 (78 mm/30 mn)	0,04 (82 mm/50 mn)	0,06 (78 mm/30 mn)
Propanol-ammoniaque (N)	0,37 (35 mm/50 mn)	0,44 (57 mm/50 mn)	0,34 (35 mm/50 mn)	0,37 (57 mm/50 mn)

Nous voyons ainsi que sur les plaques de silice MERCK, comme sur les plaques de silice KODAK, la meilleure séparation a eu lieu avec le deuxième solvant Méthanol-ammoniaque conc. (99:1). Cependant, sur les plaques MERCK nous avons obtenu des spots munis d'une traînée, donc moins nets.

D'une façon générale nous avons préféré la séparation chromatographique sur papier qui nous a fourni des spots plus nets et bien séparés.

f) Réactions d'identification

Nous avons procédé à des réactions colorées et à des réactions chimiques pures, telles que la réduction du N-Oxyde en tripélenamine, afin de confirmer l'identité du composé synthétisé par nos soins.

Pour la clarté de l'exposé, nous avons mis en parallèle, et sous forme de tableau, les réactions données par divers réactifs cités au cours des chapitres précédents, utilisés en "spot-test" sur papier Whatman, avec le chlorhydrate de tripélenamine et son N-Oxyde.

	Chte. tripéleennamine Pyribenzamine	Chte. TPNO Pyribenzamine N-Oxyde
Irradiation U.V. à 254 nm	bleu-mauve	très vive fluoresc. bleu-clair
Irradiation U.V. à 366 nm	mauve plus clair	très vive fluoresc. bleu-clair
R.naphtylamine-sulfanilique après irradiation U.V. (PRUSSMANN)	jaune-pâle (fond rose) décoloré en 24 h	rose-mauve (fond plus clair) s'accroît en 24 h
Solution éthéro-pétrolique d'iode	marron-foncé	brun-clair
R. iodoplatinique	bleu-pétrole, centre granité jaune-vert	brun-gris à centre jaunâtre
R. DRAGENDORFF modifié (BILINSKI)	orange, centre granité	léger orange-pâle
R. à la ninhydrine	gris-verdâtre	très légèrement rosé
R. bromure de cyanogène-benzidine (HUEBNER)	fluorescent (254 nm)	fluorescent (254 nm)
R. sulfovanadique (MANDELIN)	brun-noir	orangé
R. 2-4-dinitrochlorobenzène (DANILOVIC)	jaune	0
R. hydroxylamine-perchlorure de fer (ROBERTSON)	léger jaune	0
R. sulfate de cuivre-ammoniaque (GUVEN)	léger bleu-vert	0
R. p-nitraniline-acide sulfanilique (BICKEL)	jaune-pâle	très léger jaune
R. bromure de cyanogène-aniline (JONES)	jaune vif	très léger jaune

Afin d'apporter une preuve supplémentaire à l'identité de notre N-Oxyde de Pyribenzamine, nous avons repris la réaction de JONES (1949), en la réalisant en tube, telle que l'auteur l'a préconisée pour le dosage de la Pyribenzamine. Il s'agit d'une réaction au bromure de cyanogène, inspirée de la réaction de KÖNIG (1904), qui comporte la fixation de ce réactif sur le noyau pyridinique, sous forme d'un bromure de cyanopyridinium, que l'on révèle par copulation avec une amine aromatique telle que l'aniline : il se forme une substance colorée, que l'auteur appelle un "dianile".

Dans le cas du N-Oxyde de Pyribenzamine, si l'atome d'azote hétérocyclique est bloqué, -comme nous pouvons le supposer-, par un atome d'oxygène, la réaction au bromure de cyanogène ne devrait pas avoir lieu, ainsi que nous avons pu le constater pour les N-Oxydes de nicotinamide et de nicéthamide. C'est ce que nous avons pu vérifier, en effectuant les mélanges réactionnels suivants :

	Mélange N° 1	Mélange N° 2	Mélange N° 3	Mélange N° 4
Chlorhydrate TP	2 mg	0	0	00
Chlorhydrate TPNO	0	2 mg	0	0
Eau distillée	3 ml	3 ml	3 ml	4 ml
Bromure de cyanogène à 4 %	1 ml	1 ml	1 ml	0
Phthalate acide de potassium à 2 % (repos 15 minutes)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Aniline à 4 % dans l'éthanol (repos 20 minutes)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Résultat obtenu :	coloration jaunefif, et fluorescence intense à 366 nm	très légère coloration jaune très pâle, non fluorescente		

Toujours dans un but d'identification, nous avons alors procédé à des essais de réduction de notre N-Oxyde de Pyribenzamine :

= Réduction par l'acide oxalique :

10 mg de N-Oxyde sont mis en solution dans 4 ml d'acide oxalique à 1,4 g % dans l'acide chlorhydrique à 5 %. Après un contact de douze heures environ, on chauffe au bain de sable à 120° C, jusqu'à obtention d'un résidu sec, que l'on reprend par 1 ml d'éthanol. Puis on neutralise le

milieu avec 1,2 ml d'ammoniaque concentrée et on chromatographie sur papier, avec le solvant à base de butanol saturé d'eau et d'acide acétique (60:1). Le résultat est négatif : le N-Oxyde apparaît inchangé.

= Réduction par le trichlorure de titane :

Sur une prise d'essai d'environ 10 mg de N-Oxyde de Pyribenzamine, dans 1 ml d'eau, on fait agir 1 ml d'une solution de $TiCl_3$ à 15 %, et on acidifie par HCl à pH=1. On laisse en contact 30 minutes à température ordinaire, puis on évapore à sec une partie, tandis que l'autre est soumise à 30 minutes de chauffage au bain-marie avant d'être évaporée à son tour. Les résidus secs sont repris par le minimum d'eau avant d'être soumis à la chromatographie sur papier, avec le solvant précédemment cité. Ici encore, la réduction n'a pu avoir lieu. Sans doute les deux réducteurs essayés étaient-ils trop faibles, c'est pourquoi nous avons pensé utiliser l'hydrosulfite de sodium.

= Réduction par l'hydrosulfite de sodium :

Nous avons dissous dans quelques millilitres d'eau, 3 mg de chlorhydrate de TPNO et 2 mg d'hydrosulfite de sodium, et nous avons placé le mélange réactionnel pendant 2 heures au bain-marie bouillant. Puis nous avons concentré le mélange avant de le soumettre à une chromatographie sur papier sulfaté, avec le solvant à base de sulfate d'ammonium à 1 % et d'alcool isopropylique (1:2). Nous avons obtenu deux spots pour le mélange réactionnel : l'un correspondant au chlorhydrate de tripélenamine, et l'autre à du N-Oxyde en excès n'ayant pas réagi.

= Réduction par l'hydrogène en présence de Nickel de RANEY :

Nous avons opéré soit en milieu anhydre (éthanol), soit en milieux aqueux alcalin (NH_4OH au 1/10). Après 30 minutes, la consommation d'hydrogène s'étant arrêtée, le mélange réactionnel concentré est soumis à

chromatographie, avec le solvant : butanol-acide formique-eau (77:10:13). On obtient une traînée depuis le point de dépôt jusqu'au niveau du témoin Pyribenzamine. Celle-ci n'apparaît pas fluorescente à 254 nm, ce qui laisse penser à une réduction au moins partielle en Pyribenzamine.

Comme dans les cas précédents concernant la réduction des N-Oxydes de nicotinamide et de Coramine, nous avons pu constater la difficulté avec laquelle ces N-Oxydes pyridiniques se laissaient réduire. Dans le cas présent, c'est par la méthode à l'hydrosulfite de sodium, que nous avons obtenu le meilleur résultat, quoique partiel.

Parmi les réactions d'identification du chlorhydrate de tripélennamine et de son N-Oxyde, il faut souligner l'intérêt de la fluorescence extrêmement vive manifestée par ce dernier sous U.V., tant à 254 qu'à 366 nm, et qui n'avait pas été décrite à ce jour. Par ailleurs le réactif naphtylamine-sulfanilique trouve ici aussi une application inédite, permettant d'obtenir dans un cas un spot "en négatif" (Chte. TP) et dans l'autre spot "en positif" (Chte. TPNO).

D'autre part la réaction de JONES au bromure de cyanogène, positive dans le premier cas et négative dans le second, ainsi que la réduction partielle du N-Oxyde, sont autant de preuves de son identité.

III - METHODES DE DOSAGE

Nous nous sommes surtout attaché au dosage du N-Oxyde de Pyribenzamine, qui constitue un travail original; tandis que pour la Pyribenzamine, il existe un certain nombre de techniques, déjà bien éprouvées par les auteurs antérieurs, et que nous avons mentionnées au cours de la Première Partie de ce chapitre.

Nous avons utilisé successivement des méthodes spectrophotométriques, colorimétriques et enfin fluorimétriques.

a) Dosage par spectrophotométrie

Ainsi que nous l'avons déjà expliqué à propos de l'étude métabolique de la nicotinamide et de la Coramine, cette méthode consiste à éluer un spot chromatographique de N-Oxyde, puis à enregistrer son spectre dans l'ultra-violet, entre 230 et 330 nm. La mesure de la densité optique (D.O.) au niveau de la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption, fournit une indication de la concentration dans l'échantillon, à condition d'avoir au préalable étalonné l'appareil avec des quantités croissantes et connues de N-Oxyde.

Dans l'optique d'un dosage ultérieur éventuel de TPNO métabolite, nous avons réalisé une chromatographie sur papier, avec le butanol saturé d'ammoniaque (N) comme phase mobile, en déposant des spots de 20 μ l d'urine concentrée (urine de cobayes témoins, extraite par l'éthanol, et concentrée, obtenue selon la technique décrite à propos de la nicotinamide), surchargés avec des quantités croissantes de chlorhydrate de TPNO, variant entre 100 et 500 μ g.

Les spots, repérés sous U.V. à 254 ou à 366 nm, ont été élués par l'éthanol bouillant, puis la liqueur centrifugée et débarrassée de papier, a été soumise à un enregistrement spectral dans l'U.V.

Nous avons eu à ce moment la surprise d'obtenir un spectre U.V. totalement différent du spectre de référence du chlorhydrate TPNO, avec un petit maximum d'absorption situé vers 274 nm et un minimum à 264 nm.

Nous avons néanmoins procédé à la mesure de la hauteur corrigée du pic (appelée $\Delta D.O.$) à son maximum, c'est à dire à 274 nm. Cependant, comme ce pic est très peu accentué, sa mesure se trouve par là même très entachée d'erreur. C'est pourquoi nous avons abandonné ce procédé pour avoir recours concurremment à deux autres méthodes de dosage.

Recherchant l'explication de ce phénomène, après une large série d'expérimentation, conduisant toujours à l'obtention de cette courbe spectrale anormale, nous avons été amené à suspecter la libération, à partir du papier Whatman N° 1 de substances interférant avec le spectre de référence, même avec des produits témoins, et d'autant plus, aux faibles concentrations que nous laissaient attendre les résultats du métabolisme chez l'animal.

Dans une expérience récente, nous avons pu en effet constater que, en utilisant comme témoin le produit d'épuisement du papier Whatman N° 1 par le même solvant, sur une surface identique, il était possible d'atténuer sensiblement ces inconvénients, et de retrouver la courbe spectrale caractéristique du chlorhydrate de TPNO de référence, à condition de travailler sur des concentrations suffisantes de ce produit.

b) Dosage colorimétrique

Nous avons eu recours à la méthode de BRODIE (1945 et 1947), déjà éprouvée dans ce laboratoire pour des dosages d'alcaloïdes très divers, et que WAY (1950) utilisait pour le dosage de la Pyribenzamine dans l'urine de mammifères traités avec cet antihistaminique.

Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe entre la base tripélenamine et un colorant acide sulfonique, le méthylorange ou hélianthine (sel sodique de l'acide p-diméthylamino-azobenzol-sulfonique figurant au Codex). Nous avons vu quel en était le principe dans la première partie de ce chapitre, concernant les travaux antérieurs sur la Pyribenzamine.

Cette méthode s'applique donc vraisemblablement, dans son principe, aussi bien à la Pyribenzamine qu'à son dérivé N-Oxyde qui conserve un caractère basique.

Nous l'avons adaptée de la façon suivante : pour 1 à 5 ml d'éluat renfermant environ 20 μ g de produit actif, on ajoute 1 ml de solution NaOH (2,5 N) et on agite dans une ampoule à décantation avec 20 ml de dichloro-éthane pur. Après repos, on sépare les deux phases par centrifugation (10 minutes à 3000 tours/min.). La phase organique est filtrée sur papier et entonnoir préalablement séchés à l'étuve à 100° C, afin d'obtenir une liqueur exempte de solution aqueuse.

Celle-ci est traitée par 0,5 ml de réactif de BRODIE (solution saturée du sel sodique de méthylorange dans une solution d'acide borique 0,5 M), et extraite par agitation dans une ampoule à décantation sèche : on note une décoloration partielle de la phase aqueuse, et une coloration progressive de la phase organique.

DOSAGE COLORIMETRIQUE DU N-OXYDE DE TRIPELENNAMINE (TPNO) - Methode de BRODIE -

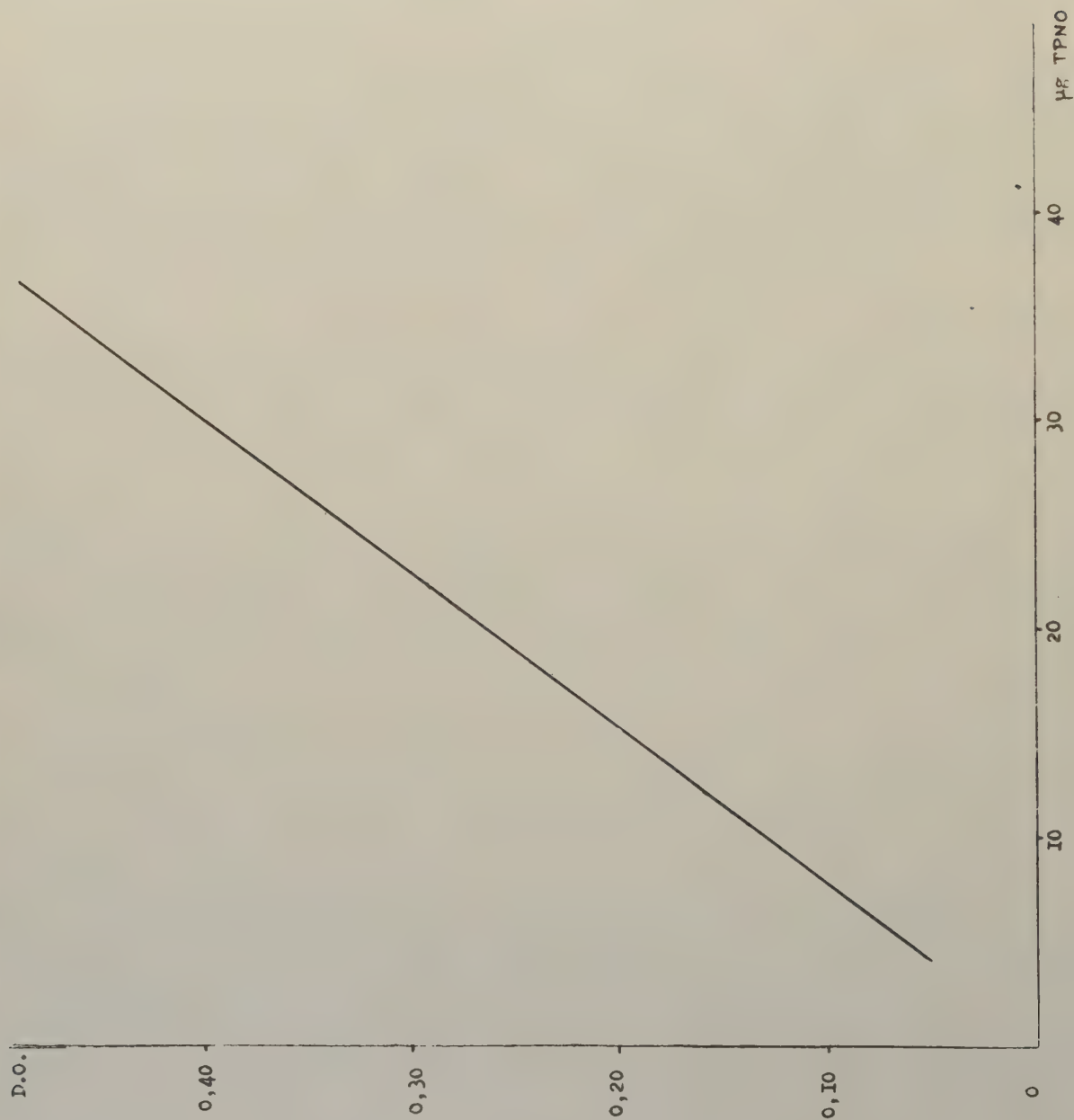


Figure 12

Après centrifugation, cette dernière est filtrée sur coton séché à 100° C. On reprend alors 15 ml de ce filtrat privé d'eau, contenant le complexe [base-méthylorange], et on l'acidifie par addition de 4 ml HCl au 1/10, afin de libérer le méthylorange, qui repasse en solution aqueuse, après agitation vigoureuse dans une ampoule à décantation. Après un temps de repos, on centrifuge afin de bien séparer la phase aqueuse, qui apparait colorée en rose.

On photomètre alors à 515 nm, par rapport à un "blanc" réalisé simultanément sur de l'eau distillée à la place de l'éluat.

Une gamme d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions sur des quantités croissantes de chlorhydrate de TPNO, échelonnées entre 10 et 40 μ g. Les résultats obtenus sont les suivants :

Chte. TPNO en μ g dans la prise	Densité Optique	D.O corrigée sur le témoin
0 (témoin sur H ₂ O)	0,015	0
10	0,130	0,115
20	0,240	0,225
30	0,440	0,425
40	0,555	0,540

Ces résultats nous ont permis de tracer une courbe d'étalonnage : c'est une droite passant par l'origine (figure 12). Elle nous servira ultérieurement lors des essais métaboliques chez l'animal.

c) Dosage fluorimétrique

Nous avons pensé mettre à profit la vive fluorescence observée lors de l'irradiation ultra-violette (à 254 et 366 nm) des solutions ou des spots chromatographiques de chlorhydrate de TPNO.

Nous avons utilisé un appareil Beckman "772 Ratio Fluorometer", où la lumière excitatrice provient d'une lampe à vapeurs de mercure, avec une enveloppe claire permettant de sélectionner la longueur d'onde excitatrice à 310, 360 ou 450 nm. Nous avons opté pour une excitation à 360 nm, qui nous a donné la meilleure sensibilité.

Après plusieurs essais, nous avons choisi une concentration de 1 mg de chlorhydrate de TPNO par litre de HCl à 1 %, qui nous permet de faire le 100 % de l'appareil, tandis que ~~sur~~ le solvant seul on réalise le zéro.

Lorsqu'on fait la mesure sur un échantillon fluorescent, limpide, et convenablement dilué, il suffit de rapporter le pourcentage lu sur l'appareil au 100 % que constitue le témoin à 1 mg/litre.

On voit ainsi que la méthode est très sensible, puisqu'elle permet de détecter le vingtième de microgramme de chlorhydrate de TPNO.

IV - ESSAIS CHEZ L'ANIMAL

Nous avons adopté le même protocole et le même matériel que pour les essais concernant le métabolisme de la nicotinamide et de la Coramine.

1. Premier essai de métabolisme de la Pyribenzamine :

En nous reportant aux données de la littérature (SPECTOR 1956) nous avons noté pour la Pyribenzamine une DL 50 de 570 mg/kg, par voie orale, chez le rat mâle. Par ailleurs la notice aimablement fournie par la société CIBA, indique une DL 50 de 535 mg/kg chez le rat, et conseille l'administration du produit simultanément avec de l'eau sucrée afin d'éviter les phénomènes de somnolence.

C'est pourquoi, n'ayant aucune donnée précise concernant le cobaye, et nous basant sur les sensibilités assez voisines de ces deux types d'animaux, nous avons choisi d'administrer des doses de 100 mg/kg. Comme il s'agissait de cobayes dont le poids avoisinait 500 grammes, nous avons décidé de leur administrer 50 mg de Pyribenzamine par vingt quatre heures, pendant trois jours consécutifs, par voie orale, dans de l'eau sucrée.

Les urines recueillies pendant trois jours, dans un récipient entouré de glace, représentent un volume d'environ 200 ml. Leur pH étant voisin de 10, nous les avons d'abord acidifiées à pH=1 avec de l'acide chlorhydrique, puis concentrées par évaporation sous pression réduite, et purifiées par l'éthanol ainsi qu'il a été précédemment décrit à propos de la nicotinamide. Nous avons ainsi obtenu un "extractif alcoolique" et une solution aqueuse des "résidus hydrosolubles". Le premier fut étudié par chromatographie, afin de procéder à la recherche d'un éventuel métabolite N-Oxyde, car, ainsi que nous l'avons vu précédemment, c'est l'extractif alcoolique qui se prête le mieux à des travaux qualitatifs, les résidus hydrosolubles n'ayant d'intérêt que pour compléter un bilan quantitatif.

Les premiers essais, réalisés en chromatographie monodimensionnelle sur papier avec le solvant "601", ne furent pas concluants : on n'observait qu'une traînée fluorescente sans spots distincts.

Nous eûmes alors recours à la technique chromatographique bidimensionnelle sur papier, réalisée en double exemplaire, qui nous avait donné satisfaction auparavant pour la nicotinamide. Le solvant étant le même que précédemment, les temps de migration de 4 h 40 et 2 h 40 respectivement. Les Rf trouvés pour les chlorhydrates de tripélenamine (0,61) et de TPNO (0,53), l'aspect sous U.V., mauve pour l'un et bleu-clair très fluorescent pour l'autre, et enfin la révélation au réactif de DRAGENDORFF de l'un des chromatogrammes, nous ont permis de localiser sur l'autre exemplaire, dans le produit de migration de l'extractif alcoolique de l'urine, deux spots présumés correspondre aux deux témoins cités. Ces spots furent élués respectivement par 3 ml d'eau distillée ou par 3 ml d'éthanol bouillants, qui, après centrifugation, et mesure en spectrophotographie U.V. nous ont fourni des résultats peu concluants :

- spot présumé TP, HCl : Longueur d'onde minimum 261-262 nm
maximum 274 nm
- spot présumé TPNO, HCl : Longueur d'onde minimum 262-268 nm
maximum 274 nm

Nous retrouvons la même courbe spectrale que lors de nos tentatives de dosage du chlorhydrate de TPNO. Nous nous sommes rendu compte depuis lors que ces mauvais résultats étaient imputables à la libération d'impuretés à partir du papier lui-même, masquant facilement le spectre du TPNO, pour lequel le coefficient d'extinction maximum est très faible, de l'ordre de 75.

Nous avons alors entrepris un deuxième essai chez l'animal.

2. Deuxième essai du métabolisme de la Pyribenzamine :

Le cobaye n'ayant pas semblé souffrir du précédent traitement, nous avons décidé d'augmenter la dose, et de la porter à 65 mg par jour, en réduisant l'opération sur deux jours. Comme précédemment le médicament est donné par voie orale avec de l'eau sucrée, en une seule prise.

Le volume recueilli représente 140 ml. On acidifie par HCl à pH=1, puis on concentre et on purifie par l'éthanol de titre croissant : il nous reste alors 1 ml d'extractif alcoolique, d'aspect sirupeux, jaune-pâle.

Ayant pu apprécier, au cours de nos précédents travaux les avantages de la chromatographie sur papier, déposée sous forme "pointillée", nous avons ainsi procédé sur 100 μ l d'extractif alcoolique, avec le même solvant "601" à base de butanol saturé d'eau et acide acétique (60:1). La migration a été réalisée sur une hauteur de 134 mm en 3 h 45.

On repère sous U.V., à 254 ou 366 nm, une zone de vive fluorescence, constituée par plusieurs petits spots, au même niveau de migration que le témoin chlorhydrate de TPNO ($R_f=0,57$) c'est-à-dire en-dessous du témoin chlorhydrate de tripélennamine ($R_f=0,72$). Par ailleurs, la chromatographie étant réalisée en double exemplaire, ceci nous permet d'en révéler un, par le réactif de DRAGENDORFF, afin de localiser au mieux les spots du métabolite N-Oxyde, sur le second.

Ces spots sont découpés et élués par 12 ml d'éthanol bouillant, puis centrifugés. L'extractif est alors examiné au spectrographe dans l'ultra-violet : le résultat n'est pas concluant puisque nous n'observons aucun maximum d'absorption.

L'éluat ci-dessus, reconcentré est à nouveau soumis à chromatographie et élution dans les mêmes conditions : cette nouvelle purification permet cette fois-ci d'observer un léger minimum à 265 nm et un léger maximum à 271-275 nm.

Une troisième chromatographie, mais bidimensionnelle, avec le solvant utilisé précédemment dans la première dimension, et avec un mélange

Propanol-eau (8:2) dans la deuxième dimension, confirme les résultats trouvés auparavant. L'élution fournit un spectre ultra-violet analogue, mais dont le pic s'accroît, tout en se maintenant à la même longueur d'onde. C'est dire que, si l'on peut relativement facilement se débarrasser de l'interférence de l'urine, il est beaucoup plus difficile d'éliminer les impuretés cédées par le papier de chromatographie.

Nous avons néanmoins essayé de réaliser une autre chromatographie avec le même solvant "601", mais bidimensionnelle et sur un papier de plus grand format (20 x 20 cm) avec un dépôt de 50 μ l d'extractif alcoolique. Après une migration de 3 h + 3 h 20, et en se reportant aux spots témoins, on a pu repérer par les moyens habituels, les taches correspondant à la tripélenamine et au N-Oxyde dans l'urine, et les éluer pour enregistrer le spectre U.V.

Pour la tripélenamine l'élution est réalisée au moyen d'acide chlorhydrique dilué à 1 %. Le spectre obtenu est à peu près conforme au spectre de référence, mais les pics d'absorption sont très peu apparents, ce qui prouve que la concentration en Pyribenzamine est très faible :

- Spectre trouvé : longueurs d'onde maximales 242 et 312-316 nm
minimum 276-280 nm

- Spectre théorique : " " maximales 242 et 310-316 nm
minimum 274 nm

Pour le dérivé N-Oxyde, on réalise l'élution par l'éthanol bouillant. Le spectre obtenu est toujours le même que celui, trouvé précédemment pour l'éluat d'un chromatogramme, où l'on avait déposé un mélange d'urine témoin et de TPNO témoin.

- Spectre trouvé : longueur d'onde maximum 274-278 nm
minimum 261-262 nm

Les résultats de ce deuxième essai de métabolisme de la Pyribenzamine chez le cobaye nous ont confirmé ceux du premier essai.

Nous avons pu cette fois-ci obtenir l'ébauche du spectre de la Pyribenzamine ce que nous n'avions pas réussi à faire lors de notre premier essai. Ceci vient confirmer les travaux des auteurs antérieurs selon lesquels on ne retrouve que peu ou pas de Pyribenzamine inchangée dans l'urine.

Par contre, en ce qui concerne le N-Oxyde de Pyribenzamine, vraisemblablement éliminé dans l'urine en quantité encore plus faible, nous n'avons pu qu'observer la fluorescence caractéristique sous U.V., sans réussir à obtenir un spectre U.V. analogue au spectre de référence.

Nous avons alors entrepris un troisième essai, en cherchant à obtenir des résultats quantitatifs, en ce qui concerne l'élimination urinaire du N-Oxyde de tripélennamine.

3. Troisième essai de métabolisme de la Pyribenzamine :

Dans ce nouvel essai, nous avons administré une seule dose orale, de 65 mg de Pyribenzamine (chlorhydrate de tripélennamine) associée avec de l'eau sucrée. Le volume total des urines émises en 24 heures, et recueillies sur de la glace, est de 60 ml. On les acidifie à pH=1 et on les purifie par l'alcool éthylique, comme précédemment. Cependant, dans le cas présent, nous avons gardé la totalité des extraits urinaires, afin de procéder à un essai quantitatif. Nous avons ainsi recueilli :

a - "l'extractif alcoolique", évaporé à sec et repris par 2 ml d'éthanol exactement.

b. la solution aqueuse des "résidus hydrosolubles", évaporée à sec, est également reprise par 2 ml d'eau distillée exactement.

Ces deux fractions, aqueuse et alcoolique, ont été soumises à des séparations chromatographiques répétées, sur papier Whatman N° 1 non imprégné, avec le système solvant à base de Butanol saturé d'ammoniaque (N), qui sépare mieux le chlorhydrate de tripélennamine ($R_f=0,92$), de son N-Oxyde ($R_f=0,57$), tout en migrant assez vite puisqu'il se déplace en moyenne de 150 mm en 4 h 30.

Ici encore, nous avons eu recours au dépôt des extraits urinaires en chromatographie "pointillée". Les spots fluorescents, situés au même niveau que le témoin TPNO, ont été élués par l'éthanol bouillant, comme au cours des essais précédents. Leurs spectres dans l'ultra-violet donnent les résultats suivants :

Nature du dépôt	Volume déposé	Volume élué	Longueurs d'onde		Δ D.O. à λ Max.
			λ Max.	λ Min.	
a. Extractif alcoolique	100 μ l	36 ml	262 nm	272 nm	0,050
b. Résidu hydrosoluble	100 μ l	6 ml	261-262 nm	274-275 nm	0,230

La mesure de la hauteur corrigée du pic, à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption (ou Δ D.O.) permet de situer l'ordre de grandeur relatif des concentrations en TPNO dans les deux phases : cette concentration est supérieure dans l'extractif alcoolique, comme dans le cas de la nicotina-mide et de la Coramine. Nous constatons par ailleurs la similitude des courbes spectrales ainsi obtenues dans l'U.V., avec celles des précédentes études métaboliques décrites, et avec celle que l'on obtient après migration et élution d'un spot d'urine témoin chargée en TPNO.

Des chromatographies bidimensionnelles, sur papier nous ont confirmé ces résultats.

Néanmoins, comme nous avons eu l'occasion de le signaler au chapitre des dosages, il est impossible de rendre un résultat valable, par la méthode spectrométrique quantitative, lorsqu'on a affaire à de très faibles concentrations en TPNO, ce qui semble se confirmer ici. C'est pourquoi nous avons eu recours aux deux autres méthodes citées, la colorimétrie et la fluorimétrie.

La méthode colorimétrique de BRODIE, fut appliquée à des éluats de chromatographies sur papier, en solvant Butanol saturé d'ammoniaque (N), selon la technique de dépôt en "pointillé". Chaque éluat dans l'eau distillée, fut soumis à la réaction avec le méthylorange, et la densité optique de la liqueur extractive finale fut mesurée et corrigée par rapport à la coloration obtenue dans les mêmes conditions avec un éluat d'urine témoin. Les résultats sont les suivants :

Nature du dépôt	Volume déposé	D.O. corrigée	Quantité totale de TPNO dans la phase étudiée
a. Extractif alcoolique	100 μ l	0,17	255 μ g
b. Résidu hydrosoluble	400 μ l	0,48	190 μ g

Nous voyons ainsi que les urines de ce troisième essai de métabolisme de la Pyribenzamine chez le cobaye, renferment $255 + 190 = 445 \mu$ g TPNO, ce qui par rapport à la dose ingérée de 65 mg, représente une élimination urinaire de 0,68 %, en 24 heures, sous forme de dérivé N-Oxyde.

Cette quantité, quoique assez faible, est cependant très visible sur les chromatogrammes, du fait de la vive fluorescence manifestée par TPNO, dont la sensibilité est de l'ordre du 1/25ème de μ g, et qui fut mise à profit pour réaliser un dosage complémentaire par fluorimétrie.

Pour cela, nous avons d'abord commencé par chromatographier l'extractif alcoolique et le résidu hydrosoluble, de la même façon que précédemment. Les spots fluorescents, situés au même niveau que TPNO sur ces chromatogrammes, ont été découpés, et placés dans 50 ml d'eau distillée, à 60° C, pendant trente minutes, dans un évaporateur rotatif, afin de réaliser une élution maximale. Puis, après s'être débarrassé des fragments de papier, l'éluat évaporé à sec a été repris par 4 ml d'acide chlorhydrique à 1 %.

Cette solution fut soumise à un dosage fluorimétrique, après centrifugation, le zéro étant réalisé sur HCl à 1 %, et le 100 % sur une solution standard de chlorhydrate de TPNO à 1 mg/litre, réalisée par nos soins. Les résultats sont les suivants :

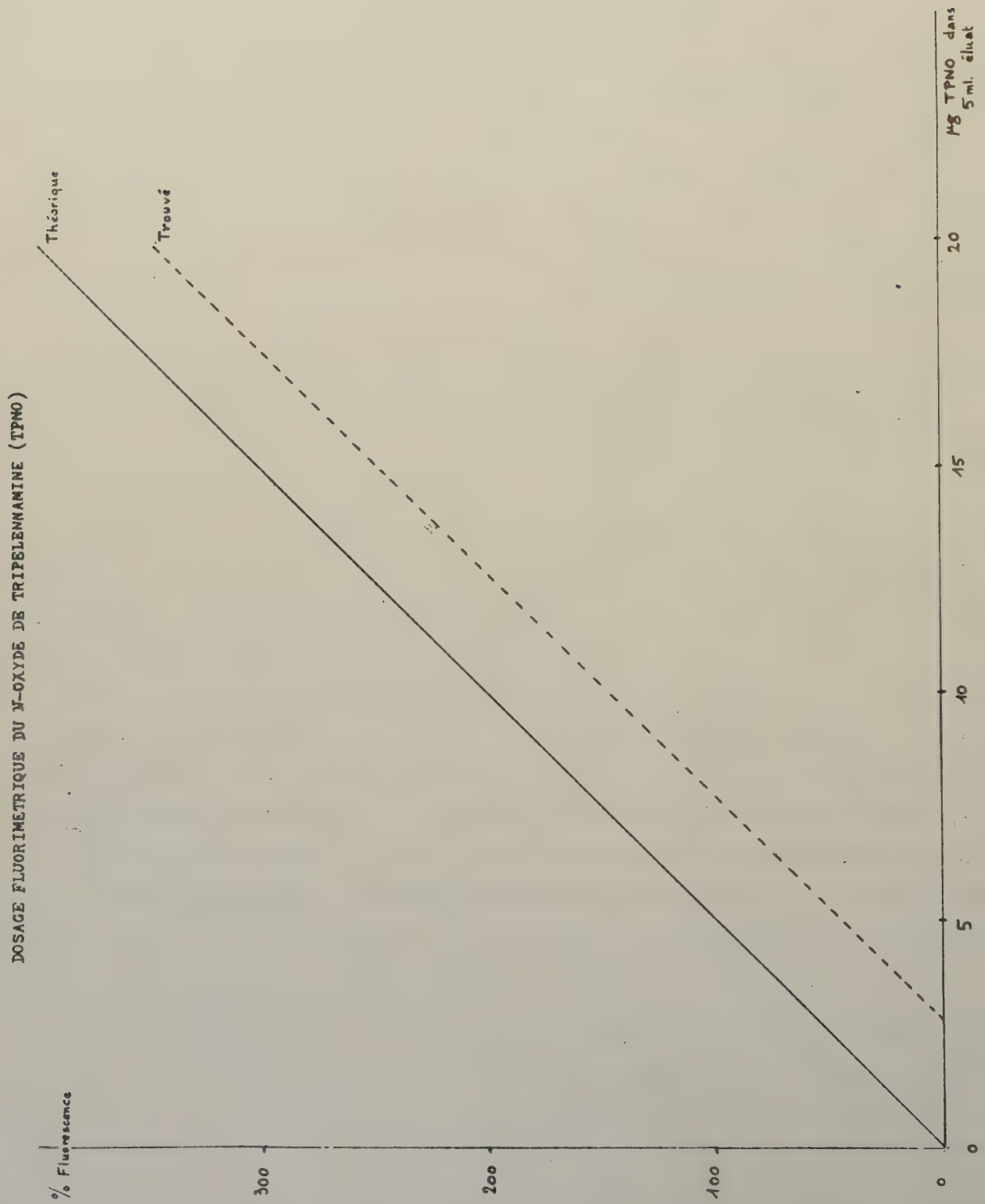


Figure 13

Nature du dépôt	Volume déposé	Fluorescence corrigée	Quantité totale de TPNO dans la phase étudiée
a. Extractif alcoolique	30 μ l	80,5 %	215 μ g
b. Résidu hydrosoluble	400 μ l	710 %	142 μ g

Les chiffres de fluorescence supérieurs à 100 %, ont été obtenus en diluant de façon appropriée les éluats, puis en faisant le calcul correspondant, afin d'exprimer tous les résultats en % de la solution témoin 1 de TPNO, à 1 mg/litre, qui, dans la plupart des cas, convenait directement.

Quant à la notion de fluorescence corrigée, nous y avons été amené en réalisant une gamme étalon, de dépôts chromatographiques de chlorhydrate de TPNO (5 μ g, 10 μ g, 15 μ g, 20 μ g), soumise à élution et dosage fluorimétrique comme précédemment. L'expérience a montré que, de façon constante, il restait en moyenne 2,8 μ g de TPNO adsorbés sur le papier, donc non éluables, ce qui entraînerait des erreurs importantes - surtout dans le cas de faibles concentrations - si l'on n'en tenait pas compte. Ceci est explicité par le graphique joint (figure 13), qui représente le % de fluorescence en fonction de la concentration en TPNO.

Si l'on veut établir un bilan à l'issue de ces dosages fluorimétriques, on constate que l'on retrouve $215 + 142 = 357 \mu$ g de TPNO dans les urines de 24 heures d'un cobaye, traité par 65 mg de Pyribenzamine, ce qui représente 0,55 % d'élimination de ce médicament, sous cette forme N-Oxyde.

On s'aperçoit que la méthode de BRODIE donne des chiffres un peu supérieurs à ceux fournis par la fluorimétrie, ce qui s'explique sans doute par une moindre spécificité de la première par rapport à la seconde.

Un essai d'hydrolyse chlorhydrique à chaud, réalisé sur la solution aqueuse des résidus hydrosolubles, nous a conduit à l'obtention de résultats pratiquement semblables à ceux concernant le résidu hydrosoluble brut, pour le dosage de TPNO. Ainsi que l'on pouvait s'y attendre, le N-Oxyde de Pyribenzamine ne s'élimine pas sous forme conjuguée.

V - CONCLUSION

En conclusion, nous voyons que, après administration de 65 mg de Pyribenzamine (chlorhydrate de tripélennamine), par voie orale, au cobaye, nous retrouvons dans ses urines de 24 heures, des quantités de tripélennamine N-Oxyde comprises entre 445 μ g (par colorimétrie), et 357 μ g (fluorimétrie), ce qui représente une élimination de 0,86 % à 0,55 % de la dose ingérée, sous forme de N-Oxyde.

Sixième Chapitre

DISCUSSION

DISCUSSION

Les exposés précédents, individualisés pour chaque type de molécule étudiée, méritent d'être reconsidérés sous une forme plus synthétique, permettant d'établir des comparaisons plus étroites.

Nous ne reviendrons pas sur les généralités concernant les aminoxydes, tant au point de vue chimique que biologique, que nous avons rédigées au début de ce travail. Nous avons pu mieux apprécier ainsi les aléas du choix des molécules à noyau pyridinique, de complexité croissante : nicotinamide, Coramine, Pyribenzamine, dont nous nous proposons de rechercher d'éventuels métabolites N-Oxydes, formés au cours de leur traversée des organismes vivants. Nous percevons mieux ainsi, la série des travaux d'approche indispensables à l'identification et au dosage de ces métabolites N-Oxydes, probablement à l'état de traces, mais qu'une synthèse préalable nous permettrait de mieux connaître.

SYNTHESE DES DERIVES N-OXYDES

Triméthylaminoxyde (TMAO) : au titre de la définition des caractéristiques de cette fonction aminoxyde tertiaire, susceptible de se manifester dans la Pyribenzamine, nous avons préparé aisément cette molécule de TMAO. L'action oxydante directe de H_2O_2 à 10 volumes, prolongée 24 heures à température ordinaire, sur la triméthylamine, selon MULLER (1940), ou mieux selon BURCKARD (1963) de H_2O_2 à 50 volumes, catalysée par le tungstate de sodium, et stabilisée par l'EDTA, nous ont donné, après recristallisation : $(\text{CH}_3)_3\text{N} \rightarrow \text{O}$, $2\text{H}_2\text{O}$, classique, dont nous avons formé le chlorhydrate et le picrate.

Nicotinamide N-Oxyde : appliquant la méthode de VON EULER (1958 b), c'est à dire contact pendant 48 heures à 65° C, de H₂O₂ à 100 volumes, en milieu acétique, et de nicotinamide, puis élimination de l'excès de H₂O₂ par le noir de platine, et recristallisation, nous avons obtenu le N-Oxyde de nicotinamide, confirmé par l'analyse élémentaire : C₆H₆O₂N₂, non hydraté.

Coramine-N-Oxyde : nous avons pensé que l'analogie de constitution devait permettre l'utilisation de la même méthode qui nous avait permis de synthétiser le nicotinamide N-Oxyde. Effectivement nous pûmes obtenir, après recristallisation dans le benzène, puis à plusieurs reprises dans le méthanol, des cristaux blancs, très hygroscopiques. L'analyse élémentaire conduit à la formule C₁₀H₁₇O_{3,5}N₂ correspondant au N-Oxyde de Coramine, cristallisé avec 1,5 molécule d'eau. Ce dérivé N-Oxyde est encore inédit, semble-t-il, à ce jour.

Pyribenzamine-N-Oxyde : ce dérivé fut synthétisé par nous selon le procédé précédent décrit par VON EULER (1958 b) avec conversion totale. Le chlorhydrate de tripélennamine N-Oxyde, très hygroscopique, correspond à la formule brute établie par l'analyse élémentaire : C₁₆H₂₅O_{2,5}N₃Cl c'est-à-dire cristallisant avec 1,5 molécule d'eau.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Points de fusion : synthétisé par nous, le triméthylaminoxide (TMAO) est en cristaux blancs, correspondant au dihydrate : $F=96^{\circ}\text{C}$; son chlorhydrate : $F=220^{\circ}\text{C}$ (au lieu de $F=217^{\circ}\text{C}$, selon GIGUERE 1961); et son picrate : $F=200^{\circ}\text{C}$, en accord avec SUWA (1909). Tandis que pour la triméthylamine (TMA): $F=124^{\circ}\text{C}$, et son chlorhydrate : $F=270^{\circ}-272^{\circ}\text{C}$.

- Nicotinamide N-Oxyde, cristallise en paillettes légères, non hygroscopiques, $F=290^{\circ}\text{C}$, voisin des chiffres de TAYLOR (1957) : $F=291^{\circ}-293^{\circ}\text{C}$, et de VON EULER (1958 b) : $F=287^{\circ}-288^{\circ}\text{C}$. Tandis que pour la nicotinamide elle-même : $F=129^{\circ}\text{C}$.

- Coramine N-Oxyde ou nicéthamide-N-Oxyde : très hygroscopique, ne permettant de prendre sa température de fusion qu'en tube scellé, sous vide, au bain d'huile : $F=182^{\circ}\text{C}$; son picrate $F=330^{\circ}\text{C}$. Tandis que pour la Coramine : $F=24^{\circ}-26^{\circ}\text{C}$, et son picrate: $F=106^{\circ}-108^{\circ}\text{C}$.

- Pyribenzamine N-Oxyde ou chlorhydrate de tripélennamine N-Oxyde, en cristaux jaune-brun d'aspect mousseux, très hygroscopiques; en tube scellé, sous vide, et au bain d'huile : $F=130^{\circ}-135^{\circ}\text{C}$. Tandis que la Pyribenzamine (chlorhydrate de tripélennamine) est en cristaux pulvérulents blancs, faiblement hygroscopiques : $F=187-189^{\circ}\text{C}$.

Les picrates, contrairement aux chlorhydrates, ne sont généralement pas hygroscopiques.

Solubilités : l'hydrosolubilité accrue des N-Oxydes, comparée à celle de leurs molécules-mères, est une de leurs caractéristiques, et s'accompagne aussi d'une élévation de leur solubilité dans les autres solvants polaires.

En opposition avec les molécules initiales, ces N-Oxydes sont généralement insolubles dans les solvants non polaires : éther de pétrole,

benzène, éther, chloroforme, permettant une purification plus poussée, et rendant compte de leur comportement exceptionnel lors de l'application de la méthode d'extraction de STAS OTTO et OGIER.

Spectres Ultra-Violets : les spectrogrammes U.V. des N-Oxydes, comparés à ceux des molécules-mères, peuvent objectiver le changement de constitution et aussi conduire à leur dosage.

- Nicotinamide et Nicotinamide N-Oxyde : se distinguent par l'effet hypsochrome, c'est-à-dire par un décalage léger du maximum d'absorption (passant de 261 à 259 nm) et plus accentué en ce qui concerne le minimum (passant de 244 à 237 nm) vers les courtes longueurs d'onde dans le cas du N-Oxyde comparé à la nicotinamide.

De plus, un effet hyperchrome, très accusé ici pour le N-Oxyde de nicotinamide, traduit l'augmentation du coefficient d'extinction à λ max, qui passe de 250 pour la nicotinamide, à 840 pour le N-Oxyde de nicotinamide.

- Coramine N-Oxyde : manifeste le même effet hypsochrome, plus intense encore au niveau de λ min. qui passe à 235-237 nm (au lieu de 245-248 nm pour la Coramine), mais un effet hyperchrome moins accusé que dans le cas du N-Oxyde de nicotinamide (E passe de 290 à 380).

- Pyribenzamine N-Oxyde : la présence d'un second cycle, aromatique, a priori étranger à la transformation, mais toutefois très proche de la nouvelle fonction N-O, puisque la substitution en α de l'hétérocycle pyridinique, peut expliquer le particularisme observé. Le spectre U.V. de la Pyribenzamine présente un minimum (270 nm) et deux maxima de part et d'autre (245 et 305 nm). La transformation en N-Oxyde conserve le minimum intact (270 nm) et refoule excentriquement les deux maxima, respectivement à 241 et 315 nm. Effet hypsochrome classique pour le premier, et bathochrome pour le second. La dérogation se poursuit dans le cas du coefficient d'extinction, qui pour le maximum relevant du noyau pyridinique passe de 500 (à 241 nm) pour la Pyribenzamine à 75 (à 245 nm) pour son N-Oxyde, manifestant ainsi un effet hypochrome net. Déjà on commence à entrevoir des difficultés pour le dosage spectrophotométrique de ce N-Oxyde.

Spectres Infra-Rouges : Les possibilités que nous offrait au laboratoire le spectrographe I.R. de BECKMAN (modèle IR 10), nous permirent de combler quelques lacunes.

Du point de vue technique, nous avons résolu l'homogénéité de nos résultats en opérant toujours dans un support de cristaux de KBr (pur pour Spectro.) toujours contrôlé : pastillage classique, obtenu par compression hydraulique de mélanges homogènes de KBr et de la substance en cours d'étude : TMA, HCl et TMAO, HCl; nicotinamide et N-Oxyde de nicotinamide; Pyribenzamine et N-Oxyde de Pyribenzamine.

Mais avec les substances liquides ou fortement hygroscopiques, telles que la pyridine, la Coramine et son N-Oxyde, nous avons utilisé l'artifice qui consiste à insérer, entre deux minces pastilles de KBr, une trace de substance, puis à comprimer à nouveau le tout sous la presse hydraulique, les concentrations étant voisines dans les deux cas..

- chlorhydrate de TMA et de TMAO : présentent dans leurs spectres I.R. un certain nombre de bandes communes, mais dans celui de TMAO se distingue un pic particulier à 935 cm^{-1} , caractéristique de l'aminooxyde aliphatique. KURODA (1966) l'avait situé entre 950 et 970 cm^{-1} .

- nicotinamide et N-Oxyde de nicotinamide : n'ayant pas trouvé de documentation concernant le spectre I.R. de la nicotinamide, ceci nous a suggéré d'établir les spectres I.R. de la filiation : pyridine, acide nicotinique, nicotinamide et nicotinamide N-Oxyde. D'une part se manifestent les caractéristiques de vibration du noyau pyridinique, du carbonyle amidé, etc..., et puis, pour le N-Oxyde de nicotinamide seulement, une bande à 1290 cm^{-1} , qui caractérise la fonction N-O des N-Oxydes pyridiniques.

- Coramine et N-Oxyde de Coramine : nous pensons apporter une contribution intéressante en publiant le spectre I.R. du N-Oxyde de Coramine. SUNSHINE (1963) avait cependant réalisé le spectre I.R. de la Coramine en solution chloroformique : nous le trouvons très comparable au nôtre, obtenu par insertion entre deux pastilles de KBr. Il confirme son étroite parenté avec celui de la nicotinamide.

Le spectre I.R. du N-Oxyde de Coramine, reproduit les principales caractéristiques de celui de la Coramine, mais avec en plus la bande

1235 cm^{-1} , imputable à la liaison N-O du N-Oxyde hétérocyclique.

- Pyribenzamine et N-Oxyde de Pyribenzamine : l'étude spectrale I.R. de la Pyribenzamine et de son N-Oxyde présente un exceptionnel intérêt, par suite de la présence dans la molécule, de deux fonctions amine tertiaire, supplémentaires, dont nous savons la haute affinité pour l'oxygène. THOMPSON (1965) avait déjà signalé les pics d'absorption à 2630 et 2500 cm^{-1} , comme importants dans le spectre I.R. de la Pyribenzamine.

Cependant, limitant comme précédemment notre étude à la gamme des fréquences situées entre 600 et 1900 cm^{-1} , nous retrouvons dans le spectre I.R. de la Pyribenzamine, la vibration de valence C-N pyridinique (1590 cm^{-1}), ainsi que les vibrations caractéristiques du radical benzylique (750 et 720 cm^{-1}).

Le spectre I.R. du N-Oxyde de Pyribenzamine, reproduit sensiblement ces mêmes bandes, mais avec un pic supplémentaire à 1260 cm^{-1} , qui ne peut être attribué qu'à la liaison N-O du N-Oxyde pyridinique. Le chiffre trouvé est intermédiaire entre celui afférent au N-Oxyde de nicotinamide (1290 cm^{-1}), et celui du N-Oxyde de Coramine (1235 cm^{-1}).

Ainsi se trouve levée l'hésitation en faveur d'autres positions N-O sur les deux atomes d'azote aminé tertiaire de la molécule de Pyribenzamine, qui, par analogie avec le TMAO (935 cm^{-1}), devraient se manifester entre 930 et 970 cm^{-1} . Peut-on alors penser à quelque inhibition de ces plus hautes affinités vis-à-vis de l'oxygène, par un encombrement spatial au niveau de ces atomes d'azote aminé tertiaires ?

REACTIONS DE DIFFERENCIATION

L'orientation toxicologique de ces recherches, conduit à sélectionner, parmi les réactions possibles de ces molécules N-Oxydes, les plus sensibles et les plus spécifiques.

Fluorescence : les vibrations de valence du groupe N-O, sous excitation U.V., peuvent parfois se manifester par une fluorescence :

- Nicotinamide N-Oxyde excitée à 254 nm, émet une fluorescence bleue intense, alors que la nicotinamide paraît violet-foncé dans les mêmes conditions; la différence est moins nette à 366 nm.

- Coramine N-Oxyde : irradiée à 254 nm, apparaît en violet-foncé, virant au rose après une dizaine de minutes d'irradiation, et laissant un spot brun dans le visible, traduisant une transformation profonde de la molécule. Dans les mêmes conditions, la Coramine apparaît en violet foncé, stable.

- Pyribenzamine et Pyribenzamine N-Oxyde : aussi bien à 254 nm qu'à 366 nm, se distinguent par la très intense fluorescence bleu-clair de cette dernière, qui permet un repérage très sensible, alors que la Pyribenzamine apparaît colorée en mauve.

Réactifs généraux : la moindre basicité des N-Oxydes peut influencer certains réactifs indicateurs tels que le vert de bromocrésol; mais elle peut aussi limiter l'aptitude à la formation de complexes avec un certain nombre de réactifs généraux des molécules azotées et surtout alcaloïdiques. En fait il s'agit de nuances.

Les réactifs iodo-bismuthiques dérivés de celui de DRAGENDORFF, et surtout la solution éthéropétrôlique d'iode (Pr. M. CHAMBON) gardent une sensibilité générale très grande, y compris pour TMA et pour TMAO.

Réactifs du groupe N-O : en dehors des propriétés oxydantes vis-à-vis de divers réactifs réducteurs classique, qui seront rappelées plus loin, il n'a point été signalé de réactions spécifiques.

Réactif de PRUSSMANN (1964 a) : nous avons essayé de voir cependant leur comportement vis-à-vis du réactif de PRUSSMANN, révélateur des nitrosamines $=N-N=O$.

Ce réactif (naphtylamine-acide sulfanilique-acide acétique) étant appliqué après irradiation de trois minutes à 254 nm sur le spot, donne une coloration rose, d'apparition plus ou moins rapide, si la réaction est positive. Notre expérience personnelle de ce réactif est la suivante :

- tandis que TMA n'est pas révélé, TMAO donne un spot rose foncé sur un fond rose clair.

- nicotinamide et Coramine se manifestent par des spots jaunes plus ou moins décolorés, sur fond rose. Les N-Oxydes correspondants donnent des spots rose-foncé, d'apparition plus lente.

- la Pyribenzamine donne un spot jaune-pâle sur fond rose clair; son dérivé N-Oxyde apparaît en rose mauve qui s'accroît en 24 heures.

Nous pensons avoir ainsi attiré l'attention sur cette réaction des N-Oxydes avec le réactif de PRUSSMANN, qui ne leur était pas destiné, et qui relève de leur groupe fonctionnel.

Réactions du noyau pyridinique : l'aptitude réactionnelle de l'atome d'azote hétérocyclique, à se condenser avec divers réactifs halogénés, et à fragiliser ce cycle, qu'une base peut ouvrir en donnant, en fonction du choix de celle-ci, des colorations variées, est à la base des classiques réactions de KÖNIG et de ROSS, si utilisées pour le dosage des molécules pyridiniques.

On pouvait se demander si la transformation en N-Oxyde modifierait cette réactivité ? Dans ce but nous avons essayé divers réactifs :

- Réactif de DANILOVIC (1966) au 2-4 dinitro chlorobenzène, puis hydroxyde de sodium; la nicotinamide apparaît légèrement rosée puis jaune, la Coramine mauve puis brun, et la Pyribenzamine vire au jaune. Les N-Oxydes de ces molécules ne donnent aucune coloration.

- Réactif de HUEBNER (1951) au bromure de cyanogène, puis benzidine, donne avec la nicotinamide une coloration rose à rouge, mais rien avec son N-Oxyde. Avec la Coramine, coloration jaune-vif devenant orange, mais avec son N-Oxyde, coloration jaune à peine perceptible. Avec la Pyribenzamine et son N-Oxyde il se manifeste une fluorescence sous lumière U.V.

- Réactif de JONES (1949) au bromure de cyanogène, puis phtalate acide de potassium, puis aniline; avec la nicotinamide donne une coloration jaune-vif mais rien avec son N-Oxyde; avec la Coramine coloration rouge-orangé et seulement jaune très pâle avec son N-Oxyde. De même avec la Pyribenzamine, spot jaune vif et avec le N-Oxyde coloration très faiblement jaune-pâle.

Ainsi s'affirme le freinage, imposé par la fonction N-Oxyde, à la réactivité si typique de l'atome d'azote pyridinique, et qui apporte un critère significatif de différenciation entre les N-Oxydes pyridiniques et leurs molécules-mères.

REDUCTION

La possibilité de ramener, par réduction facile, le N-Oxyde à la molécule initiale, offrirait des commodités d'identification, de dosage, et aussi des perspectives sur leur évolution biologique. De nombreux réactifs réducteurs ont été utilisés ainsi qu'en témoignent les multiples travaux que nous rapportons concernant en particulier le TMAO.

- le N-Oxyde de nicotinamide a été soumis à la réduction par VON EULER (1959 c) en vue de son identification, en utilisant soit l'acide ascorbique, soit la réductone en solution alcoolique. WIELAND (1963) a utilisé l'hydrogène catalysé par le nickel de RANEY.

Nous avons -sous contrôle chromatographique- essayé divers processus de réduction. L'hydrosulfite de sodium, cependant préconisé par KOISUMI (1965) pour la réduction de TMAO, nous a laissé, après deux heures d'ébullition le N-Oxyde de nicotinamide inchangé. L'acide oxalique, en milieu chlorhydrique dilué, n'aboutit qu'à une réduction partielle. L'hydrogénation catalysée par le nickel de Raney, fut tentée en divers milieux (neutre, ammoniacal, acétique), à la température du laboratoire, et à la pression atmosphérique : elle ne donne, au mieux, en milieu acétique, qu'une réduction partielle, qui ne paraît pas devoir se prolonger au-delà de 30 minutes, ainsi qu'en témoigne la cessation de l'absorption d'hydrogène.

- le N-Oxyde de Coramine : décrit par nous pour la première fois, résiste totalement à l'action réductrice de l'acide oxalique. Le trichlorure de titane, en milieu chlorhydrique également, et pour des durées et des températures d'action différentes, ne conduit qu'à une réduction partielle, accompagnée de la formation probable d'un complexe avec les sels de titane.

Par contre, l'hydrogène - nickel de Raney, nous assura en milieu ammoniacal dilué, une réduction complète en 20 à 25 minutes.

- le N-Oxyde de Pyribenzamine : se montra totalement résistant à l'acide oxalique et au trichlorure de titane, et ne fut que partiellement réduit par l'hydrosulfite de sodium.

L'hydrogène de Raney, réalisa par contre une réduction beaucoup plus avancée en Pyribenzamine.

Ainsi avons-nous la preuve d'une résistance très marquée des N-Oxydes pyridiniques vis-à-vis de la réduction, témoignant en accord avec OCHIAI (1943) de la stabilité de ce type de molécules.

SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Les précieuses ressources analytiques offertes pour l'identification et la purification des constituants d'un mélange, par la chromatographie, nous ont conduits à de longues investigations. Nous avons expérimenté de très nombreux systèmes de phases mobiles, pour ne retenir que les systèmes de solvants nous assurant une bonne séparation, des spots nets, et aussi des vitesses de migration convenables.

- avec le mélange des chlorhydrates de TMA et de TMAO, la chromatographie sur couches minces d'alumine ou de gel de silice s'est montrée inefficace.

Les meilleures séparations furent obtenues sur papier Whatman N°1, avec le mélange : butanol-acide formique-eau (77:10:13), ou avec la phase organique du mélange : chloroforme-benzène-eau (10:10:6).

- les deux couples voisins nicotinamide et son N-Oxyde, Coramine et son N-Oxyde, ont des comportements très analogues.

La chromatographie sur couches minces de gel de silice fut essayée, d'une part sur plaques de verre classiques (Merck F 254), et d'autre part sur film plastique (Kodak K301 V) comportant un liant à base d'alcools polyvinyliques. Les meilleurs résultats furent obtenus sur les plaques Merck, avec les solvants : propanol-ammoniaque N/1 (95:5), ou isopropanol-ammoniaque N/1 -eau (20:1:2). Sur film Kodak, la phase mobile : chloroforme-méthanol (15:5), paraît convenir, et migre assez rapidement.

Sur papier, l'essai d'une quinzaine de mélanges solvants nous a fait retenir essentiellement le suivant : butanol saturé d'eau - acide acétique (60:1), et pour un travail plus rapide : butanol-acide formique-eau (77:10:13).

- la séparation du mélange Pyribenzamine et Pyribenzamine N-Oxyde sur couche mince de silice, semble meilleure sur film Kodak, avec le mélange solvant : méthanol-ammoniaque concentrée (99:1).

Sur papier, parmi les nombreux mélanges solvants essayés, notre choix s'est finalement porté sur du butanol saturé d'ammoniaque N/1. Signalons aussi l'alcool amylique saturé d'ammoniaque N/1, qui donne des Rf plus différenciés, mais migre beaucoup plus lentement.

DOSAGES

Les impératifs liés à d'éventuels microdosages de N-Oxydes dans les urines, nous ont conduit à adopter la haute purification que peut donner la chromatographie -bidimensionnelle si nécessaire-, sur papier. Sur l'éluat des spots, préalablement identifiés, est ensuite effectué le dosage, et le plus souvent par spectrophotométrie.

La sélectivité de la détermination de la densité optique corrigée ($\Delta D.O.$) selon la méthode de BOLT et FORREST (1967), avec étalonnage préalable, s'est montrée très valable.

Parfois, une précaution supplémentaire -indispensable dans certains cas-, a dû être prise, imposée par l'interférence de substances libérées lors de l'élution des spots chromatographiques sur papier : elle consiste à utiliser comme témoin, un éluat identique d'une même surface de papier à chromatographie.

Dans le cas du N-Oxyde de Pyribenzamine, intensément fluorescent en lumière U.V., la fluorimétrie (sur appareil Beckman, 772 Ratio Fluorometer), par excitation à 360 nm, permet d'atteindre une haute sensibilité, avec la notion de "fluorescence corrigée", tenant compte de l'adsorption inéluable de petites quantités de N-Oxyde sur le papier chromatographique. Cependant la méthode colorimétrique de BRODIE (1947), dûment étalonnée, nous a apporté une aide plus généralisable.

EXPERIMENTATION ANIMALE

Notre objectif, la recherche de métabolites N-Oxydes, nous a fait choisir, pour des raisons de commodité, le cobaye, de 450 à 500 grammes, pour être soumis à l'ingestion des médicaments essayés, et après récolte de ses urines à basse température, la recherche dans celles-ci des métabolites.

L'isolement de ces N-Oxydes, à l'hydrosolubilité accrue, s'avère difficile lors de l'application de la méthode de STAS OTTO, par suite de leur dispersion dans les phases extractives. Il en est de même pour une séparation chromatographique sur colonne de cellulose ou sur charbon actif, adsorbant trop général.

Dès lors, nous avons été amené à mettre au point le protocole suivant, après divers tâtonnements, éliminant notamment le traitement des urines par l'uréase.

Les urines, légèrement acidifiées, sont évaporées sous pression réduite. Le résidu, additionné d'alcool, laisse un insoluble. La solution alcoolique évaporée, laisse un extrait que l'on traite par l'éthanol pur, et l'opération est encore renouvelée. Finalement on obtient une solution alcoolique dite "extractif alcoolique", et les insolubles précédemment séparés, sont réunis en une solution aqueuse dite des "résidus hydrosolubles".

Ces deux types d'extraits sont soumis à une chromatographie préparative sur papier, selon notre technique de dépôt "en pointillé". Nous avons adopté les phases mobiles précédemment sélectionnées. Les spots des métabolites N-Oxydes sont identifiés, et à la faveur des témoins latéraux, leur éluat permet une nouvelle chromatographie purificatrice, dans certains cas bidimensionnelle. L'éluat des fractions individualisées permet le dosage.

D'autre part, une recherche systématique d'éventuels conjugués de ces N-Oxydes, est conduite par hydrolyse chlorhydrique d'une fraction de la solution aqueuse des "résidus hydrosolubles".

OBSERVATIONS METABOLIQUES : RESULTATS

Nicotinamide : l'administration, par voie orale, de 150 mg de nicotinamide au cobaye, placé dans un dispositif permettant de recueillir les urines de 24 heures, et l'application du protocole analytique précédent, ont révélé dans l'"extractif alcoolique" les deux spots caractéristiques de la nicotinamide et de son N-Oxyde. Les spectres U.V. de leurs éluats ont permis de les caractériser. Leur dosage, rapporté à la totalité des urines de 24 heures, est de 0,99 mg en moyenne pour le N-Oxyde, et de 2,58 mg pour la nicotinamide. Une chromatographie bidimensionnelle, donne des concentrations plus faibles, respectivement 0,65 mg et 1,94 mg. La phase "résidu hydrosoluble" conduit à des spectres très comparables, et correspondant à 0,14 mg de N-Oxyde et 0,54 mg de nicotinamide.

Aussi pouvons-nous affirmer la présence du métabolite nicotinamide-N-Oxyde dans les urines : 1,13 mg correspondant à 0,75 % de la dose ingérée; la nicotinamide : 3,12 mg représentant 2,07 %. Nous remarquons leur prédominance dans l'"extractif alcoolique".

BONAVITA (1961) avait trouvé des chiffres plus faibles : 0,38 % de N-Oxyde et 0,54 % de nicotinamide, dans les urines de 12 heures seulement, il est vrai, et chez la souris au lieu du cobaye.

Les examens pratiqués après hydrolyse acide de la solution dite des "résidus hydrosolubles", n'ont pas permis de détecter un accroissement du taux de N-Oxyde. On en conclut que le métabolite nicotinamide N-Oxyde s'élimine uniquement sous forme libre, non conjuguée.

Coramine (nicéthamide) : le cobaye ingère 40 mg de Coramine. Deux expérimentations, selon le protocole général fixé, conduisent à des résultats identiques, confirmés en chromatographie bidimensionnelle :

- absence de Coramine, dans l'"extractif alcoolique" et dans la solution des "résidus hydrosolubles" de l'urine de 24 h.

- présence de Coramine N-Oxyde caractéristique : 3 mg à 3,02 mg dans l'"extractif alcoolique", et des traces de 0 à 0,54 mg dans les "résidus hydrosolubles". L'hydrolyse chlorhydrique ne libère ni Coramine ni N-Oxyde.

Le métabolite Coramine-N-Oxyde, ainsi signalé pour la première fois, s'élimine donc à l'état libre, et sa concentration dans l'urine de 24 h peut atteindre 7,5 % de la quantité ingérée par le cobaye. Cette observation montre, chez la même espèce animale, le cobaye, une différence manifeste entre le métabolisme de la nicotinamide et de son dérivé diéthylié, la Coramine. Celle-ci ne s'élimine pas en nature et son métabolite N-oxydé est à concentration plus élevée 7,5 % au lieu de 0,75 %.

Pyribenzamine (Chlorhydrate de tripélennamine) : Après différents essais, on décide de faire ingérer au cobaye, 65 mg de Pyribenzamine mélangé à de l'eau sucrée. La chromatographie bidimensionnelle de l'"extractif alcoolique" des urines de 24 h, suivie de l'analyse du spectre U.V. permet d'affirmer la présence de tripélennamine et de son métabolite, le tripélennamine N-Oxyde.

Le dosage du métabolite N-Oxyde, défectueux par spectrophotométrie U.V., est repris par la méthode de BRODIE : il révèle 0,255 mg dans l'"extractif alcoolique" et 0,190 mg dans le "résidu hydrosoluble" : en tout 0,445 mg soit 0,68 % de la quantité de Pyribenzamine ingérée.

Le dosage fluorimétrique, plus sélectif, détermine 0,215 mg de N-Oxyde dans l'"extractif alcoolique" et 0,142 mg dans les "résidus hydrosolubles", soit pour la totalité des émissions urinaires de 24 h : 0,357 mg représentant 0,55 % de la quantité ingérée.

L'hydrolyse chlorhydrique n'a pas démasqué de conjugaison du N-Oxyde ou de la tripélennamine.

Aucun travail antérieur, à notre connaissance, n'avait signalé la présence de ce métabolite N-Oxyde de la tripélennamine, ni chez l'homme, ni chez les animaux.

Arrivé aux termes de ce travail, nous pensons avoir à peu près atteint le but que nous nous étions proposé. En établissant une méthode sensible d'extraction, de séparation chromatographique, d'identification et de dosage, des métabolites N-Oxyde -préalablement synthétisés par nous-, de molécules médicamenteuses à squelette pyridinique, de complexité croissante : nicotinamide, Coramine, Pyribenzamine, nous croyons avoir ouvert une nouvelle voie pour la recherche de ces métabolites jusqu'ici peu connus, voire même inconnus.

Septième Chapitre

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

La découverte de la génèse, dans le monde vivant, de molécules aminoxydes ou N-Oxydes, aux propriétés pharmacodynamiques plus atténuées que celles des amines tertiaires ou hétérocycliques initiales, attirera l'attention sur ces processus d'oxydation in-vivo et sur le rôle de ces métabolites.

Nous avons pensé consacrer ce travail à la recherche chez l'animal, d'éventuels métabolites N-Oxydes de substances médicamenteuses. Notre choix s'est porté sur des molécules à squelettes pyridiniques et de complexité croissante : nicotinamide, Coramine ou nicéthamide qui est son dérivé di thyl , et Pyribenzamine ou chlorhydrate de tripélennamine qui est le chlorhydrate de [benzyl(pyridyl-2) amino] -1 diméthylamino-2 éthane.

1 . A titre de témoin des N-Oxydes d'amines tertiaires, nous avons préparé le trim thylaminoxide par action sur la triméthylamine de l'eau oxygénée, soit selon MULLER, soit selon BURCKARD. Le produit cristallisé (F:96 C) a été transformé en chlorhydrate (F:220 C) et en picrate (F:200 C).

- Le nicotinamide N-Oxyde est obtenu, en nous inspirant de Von EULER, par oxydation en milieu acétique, de la nicotinamide par le peroxyde d'hydrogène. Les cristaux blancs, pailletés, non hydratés (F:290 C) répondent à la formule $C_6H_6O_2N_2$. Le picrate (F:154 C).

- Le Coramine N-Oxyde est synthétisé par nous   partir de la Coramine (CIBA) selon la technique conduisant au nicotinamide N-Oxyde. Les cristaux blancs, très hygroscopiques (F:182 C) donnent à l'analyse la formule $C_{10}H_{17}O_{3,5}N_2$, correspondant au N-Oxyde de Coramine, cristallisant avec 1,5 molécule d'eau.

- Le Pyribenzamine N-Oxyde (chlorhydrate de tripélennamine N-Oxyde) est de même synthétisé à partir de la Pyribenzamine (CIBA) selon la technique précédente, inspirée de Von EULER. Les cristaux, d'aspect mousseux

(F:130°-135° C) sont très hygroscopiques. L'analyse leur donne la formule $C_{16}H_{25}O_{2,5}N_3Cl$, comportant 1,5 molécule d'eau de cristallisation.

2°. Les solubilités de ces molécules N-oxydées, comparées à celles des molécules initiales, se manifestent très accrues dans l'eau et les autres solvants polaires, mais très diminuées dans les solvants non polaires. Cette affinité pour l'eau peut rendre compte de l'hygroscopie de certains d'entr'eux.

3°. Les spectres U.V. de ces N-Oxydes, que nous avons déterminés, rapportés à ceux des molécules d'origine, traduisent l'influence du groupe $N \rightarrow O$, par le décalage hypsochrome du maximum et du minimum d'absorption et l'effet hyperchrome sur la densité optique, tout au moins pour les dérivés pyridiniques simples comme le nicotinamide N-Oxyde et le Coramine N-Oxyde.

Dans le Pyribenzamine N-Oxyde, de formule plus complexé, l'effet hypsochrome sur le maximum d'origine pyridinique, s'accompagne d'un effet bathochrome sur le deuxième maximum du spectre. De plus se manifeste un effet hypochrome massif, sur la densité optique au premier maximum d'absorption.

4°. Les spectres I.R. que nous avons enregistrés, après pastillage avec le bromure de potassium, ou pour les composés liquides ou hygroscopiques, après insertion entre deux minces pastilles de bromure de potassium et compression ultérieure, nous ont permis de retrouver la filiation pyridinique et de caractériser la vibration de valence du groupement N-O. Celle-ci se situe :

- à 1235 cm^{-1} pour le Coramine N-Oxyde.
- à 1290 cm^{-1} pour le nicotinamide N-Oxyde.
- à 1260 cm^{-1} pour le **Pyribenzamine** N-Oxyde.

Le pic correspondant, dans le triméthylamine N-Oxyde, nous a été révélé à 935 cm^{-1} , et ainsi affirme la position sur l'hétérocycle de la liaison N-O, dans le Pyribenzamine N-Oxyde.

5°. Parmi les réactions de différenciation des molécules initiales et de leurs N-Oxydes, nous avons pu constater la fluorescence beaucoup plus accusée de ceux-ci, lors de l'irradiation U.V. à 254 nm. Cette fluorescence est particulièrement intense pour le Pyribenzamine N-Oxyde.

Les réactifs généraux des alcaloïdes et amines tertiaires, donnent des réactions très positives, à peine atténuées peut-être par la moindre basicité des N-Oxydes.

Nous avons pu démontrer que, par une certaine analogie avec les nitrosamines N-N=O , les N-Oxydes $\text{>N} \rightarrow \text{O}$ réagissaient positivement avec le réactif de PRUSSMANN (naphtylamine-acide sulfanilique-acide acétique) alors que les molécules-mères sont inertes.

6°. Nous avons recherché l'influence possible de la liaison oxygène-azote sur la réactivité caractéristique de l'azote pyridinique, révélée notamment par la réaction de KÖNIG au bromure de cyanogène suivie de l'addition d'une base.

Les variantes de cette réaction (DANILOVIC, HUEBNER, JONES), appliquées aux N-Oxydes synthétisés par nous, se sont montrées négatives, contrastant avec la positivité des molécules-mères, affirmant ainsi le blocage oxygéné de l'aptitude fixatrice de l'atome d'azote hétérocyclique.

7°. La réactivité plus grande des molécules initiales autant, qu'une appréciation de la stabilité des N-Oxydes, nous ont conduit à étudier la réduction de ces dérivés.

Nos N-Oxydes pyridiniques ont entièrement résisté à l'action réductrice de l'acide oxalique en milieu chlorhydrique.

L'hydrosulfite de sodium, ainsi que le trichlorure de titane ne les ont, au mieux, que partiellement réduits.

L'hydrogène, catalysé par le nickel de Raney, réduit complètement les N-Oxydes de la Pyribenzamine et de la Coramine, mais partiellement le N-Oxyde de nicotinamide.

Ainsi que le contrôle très exactement la chromatographie, ces N-Oxydes pyridiniques se montrent fort résistants aux agents de réduction.

8°. La méthode chromatographique, expérimentée en vue d'obtenir les meilleurs isollements, s'est montrée sur papier la plus appropriée à nos besoins, malgré les résultats favorables obtenus sur couches minces de gel de silice, sur divers supports. Des mélanges solvants, après un grand nombre d'essais, ont pu être sélectionnés pour leur meilleure adaptation à chaque couple : N-Oxyde et molécules -mère.

9°. Un protocole de microdosage a été mis au point, comportant isolement et purification chromatographique des métabolites, puis élution des spots identifiés. La spectrophotométrie U.V. des éluats, avec détermination de la densité optique corrigée ($\Delta D.O.$), selon la méthode du "background cancellation" et étalonnage, s'est révélée précise. La fluorimétrie fut très sensible dans le cas du Pyribenzamine-N-Oxyde. La méthode colorimétrique de BRODIE, dûment étalonnée, est plus largement utilisable.

10°. L'expérimentation animale a été finalement conduite ainsi chez le cobaye. On fait ingérer des quantités précises des médicaments en cause, et l'on récolte à basse température les urines de 24 heures, qui sont immédiatement analysées.

11°. L'extraction des métabolites N-Oxydes, difficile par la classique méthode toxicologique de STAS-OTTO-OGIER-KOHN-ABREST ..., par suite de leur dispersion entre les différentes phases, a été obtenue dans un "extractif alcoolique", par des extractions répétées de l'urine évaporée au moyen de solutions éthanoliques de titre croissant et aussi dans une solution aqueuse dite des "résidus hydrosolubles".

La chromatographie semi-préparative, sur papier avec étalement des dépôts "en pointillé" et addition de témoins latéraux séparés, est suivie de l'élution des spots, pré-identifiés.

La chromatographie purificatrice mono- ou bi- dimensionnelle, de l'éluat, permet finalement l'obtention de spots très nets, assurant l'identification. L'élution de ces derniers conduit au dosage spectrophotométrique, à fluorimétrique, ou colorimétrique.

12°. La nicotinamide fut ingérée par le cobaye à la dose de 150 mg. Nous avons pu, dans la totalité des urines de 24 heures, très nettement identifier le métabolite nicotinamide N-Oxyde et aussi la nicotinamide. Nous avons pu doser cette élimination en 24 h : 1,13 mg de nicotinamide N-Oxyde représentant 0,75 % de la quantité ingérée et 3,12 mg de nicotinamide correspondant à 2,07% de la quantité administrée.

Le métabolite nicotinamide N-Oxyde s'élimine libre, non conjugué.

13°. 40 mg de Coramine sont administrés au cobaye, par ingestion. Dans les urines de 24 h, nous caractérisons, selon le protocole général, et dosons 3,02 mg de Coramine N-Oxyde, soit 7,5 % de la quantité ingérée.

Le Coramine N-Oxyde, signalé ainsi pour la première fois parmi les métabolites, est éliminé à l'état libre. Nous constatons l'absence de Coramine.

14°. La Pyribenzamine est ingérée à la dose de 65 mg pour le cobaye. Nous pouvons identifier dans les urines de 24 h de très faibles quantités de tripélenamine, et son métabolite N-Oxyde (plus explicitement Pyribenzamine N-Oxyde). Le dosage fluorimétrique, plus spécifique que la méthode de BRODIE fixe à 0,357 mg la quantité de Pyribenzamine N-Oxyde éliminée en 24 h, soit 0,55 % de la dose absorbée.

Aucun travail antérieur n'avait signalé la présence de ce métabolite N-Oxyde, ni chez l'homme ni chez les animaux soumis à la Pyribenzamine.

15°. Nous pensons ainsi, sur la base des produits purs synthétisés par nous, avoir établi un protocole analytique, satisfaisant à la rigueur exigée des méthodes toxicologiques, et susceptible de conduire à la révélation des métabolites à fonction N-Oxyde, que l'ambiguïté de leurs propriétés physico-chimiques a longtemps laissé inconnus.

La résistance aux habituels réactifs réducteurs, que nous avons démontrée chez les N-Oxydes à squelette pyridinique, laisse naître un doute sur leur intervention dans les processus d'oxydo-réduction en biologie. Elle invite plutôt à voir en eux, des produits orientés vers la détoxication et l'élimination.

Mais la présence de ces métabolites N-Oxydes est un témoin sûr du passage dans l'organisme de la substance-mère initiale, même si celle-ci ne se retrouve plus dans les émonctoires, ainsi qu'en apporte la preuve notre expérience chez le cobaye avec la Coramine et, de ce fait, peut incidemment avoir une valeur médico-légale irrécusable.

Le Président de la Thèse :

VU et permis d'imprimer

LYON, le 18 novembre 1968

VU, le Doyen :



Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS

Huitième Chapitre

BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E

ABELSON D., BOYLE A.

Effects of UV radiation on nicotinic acid and related compounds.
Biochem. J. 1963, 89 (1), 19 P - 20 P.

ABELSON D., PARTHE E., LEE K.W., BOYLE A.

Spectral and biological changes induced in nicotinic acid and related compounds by ultra-violet light.
Biochem. J. 1965, 96, 840-852.

ABRAMOVITCH R.A.

A new method for the deoxygenation of aromatic N-oxides.
Canad. J. Chem. 1961, 39, 2134-5.

ACHER J.

Contribution à l'étude des oxydes d'amines tertiaires.
Thèse Sciences Paris, 1964.

ACKERMANN D., POLLER K., LINNEWEH W.

Das TMAO als biologischer Wasserstoff Acceptor.
Ber. 1926, 59, 2750-1.

ACKERMANN D., LIST P.H.

Über das Vorkommen von TMAO, Homarin, Trigonellin und einer Base $C_4H_9O_2N$ in der Krabbe.
Z. Physiol. Chem., 1957, 306, 260-264.

ANDERSON D.W., FELLERS C.R.

The occurrence of TMA and TMAO in fresh water fish.
Food Research, 1952, 17, 472-4.

ANGELETTI A.

Genalkaloids
Ann. Schiaparelli, 1932, 6, 146-52.
in C.A. 1932, 26, 6063-5.

ARDAILLOU R., AMIEL C., PELE M.F.

Acidification des urines après ingestion de chlorhydrate de choline. Rôle du TMAO comme accepteur d'hydrogène dans l'urine.
Métabolisme de l'eau et des électrolytes 1965, 7 (1), 5-19.

ARTOM C., LOFLAND H.B.

Choline deamino-methylase of rat-liver mitochondria.

Congrès International de Biochimie. Résumés communs, 3ème Congrès Bruxelles, 1955, 40
in C.A. 1957, 51, 8180 h.

ARTOM C., CROWDER M.

Metabolism of methyl-labelled choline, in surviving liver slices.

Arch. Biochem. 1950, 29, 227-8.

AUTERHOFF H.

Die Analytik einiger synthetischer Antihistamine.

Arch. Pharm. 1950, 283, 244-8.

BACH S.J.

Biological methylation.

Biol. Rev. Cambr. Phil. Soc., 1945, 20, 158-76.

BAIRD E.A., WOOD A.J.

Reduction of TMAO by bacteria : The Micrococcaceae.

J. Fish. Res. Board Can. 1944, 6, 243. in C.A. 1944, 38, 4642.6

BAKER J.R., CHAYKIN S.

The biosynthesis of TMAO (Preliminary note).

Biochim. Biophys. Acta. 1960, 41, 548-50.

BAKER J.R., CHAYKIN S.

The biosynthesis of TMAO.

J. Biol. Chem. 1962, 237/1, 1309-13.

BAKER J.R., STRUEMLER A., CHAYKIN S.

A comparative study of TMAO biosynthesis.

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 58-64.

BALDWIN E.

Dynamic aspects of Biochemistry.

Cambridge 1947; cité par DYER 1952.

BANDIER E.

A colorimetric reaction for the quantitative estimation of nicotinic acid.

Biochem. J. 1939, 33, 264-71.

BARUFFINI A.

Electrophoresis and paper chromatography of some antihistaminics.

Farmaco (Pavia), Ed. prat. 1958, 13, 459-65.

in C.A. 1959, 53, 16.473 b.

BARRENSCHEEN H.K., PANTLITSCHKO M.

Die Methylierung durch Pflanzliche und Tierische Gewebe.

Z. Physiol. Chem. 1949, 284, 250-6.

BEATTY S.A., GIBBONS N.E.

Measurement of spoilage in fish.

J. Biol. Board Can. 1936 et 1937, 3 (1), 84-91.

BEATTY S.A.

Studies on fish spoilage, II. Origin of TMA produced during the spoilage of cod muscle press juice.

J. Fish Res. Board Can. 1938, 4, 63-8.

BEATTY S.A.

Studies on fish spoilage, III. The TMAO content of the muscles of Nova Scotia fish.

J. Fish. Res. Board Can. 1939, 4, 229-32.

BECKETT A.H., HEWICK D.S.

The N-oxidation of Chlorpromazine in-vitro, the major metabolic way using rat liver microsomes.

J. Pharm. Pharmacol., 1967, 19 (2), 134-6.

BECKETT A.H.

Quantitative aspects of oxidative metabolism of phenothiazines by rat liver microsomes.

Agressologie 1968, 9 (1), 99-102.

BELLAMY L.J.

The infra-red spectra of complex molecules.

(Methuen & Co Ltd.), 1958.

BEMM H., ROTZCH W.

Trimethylaminausscheidung bei Kaninchen nach Zufuhr von ¹⁵N TMA und TMAO.

Acta Biol. Med. Germ., 1962, 9, 664-73.

BENOIT G.J., NORRIS E.R.

Effect of formaldehyde on the volatilizations of ammonia, mono-di- and tri-methylamines.

Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1942, 14, 823-5.

BERGMANN F.

Colorimetric determination of amides as hydroxamic acids.

Anal. Chem., 1952, 24, 1367-9.

BICKEL M.H., BAGGIOLINI M.

The metabolism of Imipramine and its metabolites by rat liver microsomes.

Biochem. Pharmacol., 1966, 15 (8), 1155-69.

BILINSKI E.

Biosynthesis of trimethylammonium compounds in aquatic animals.

J. Fish. Res. Board Can., 1960, 17 (6), 895-902.

BILINSKI E.

Biosynthesis of trimethylammonium compounds in aquatic animals. Role of betaine in the formation of TMAO by lobster.

J. Fish. Res. Board Can. 1961, 18 (2), 285-6.

BILINSKI E.

Choline metabolism in marine crustaceae.

J. Fish Res. Board Can. 1962, 19, 505-10.

BILINSKI E.

Biosynthesis of trimethylammonium compounds in aquatic animals. Precursors of TMAO and betaine, in marine teleosts.

J. Fish Res. Board Can., 1964, 21 (4), 765-71.

BOLT A.G., FORREST I.S.

Assay of chlorpromazine glucuronides in human urine.

J. Pharm. Sci., 1967, 56, 1533-1534.

BONAVITA V., NARROD S.A., KAPLAN N.O.

Metabolites of Nicotinamide In mouse urine : Effects of azaserine.

J. Biol. Chem. 1961, 236 (3), 936-9.

BREGOFF H.M., ROBERTS E., DELWICHE C.C.

Paper chromatography of quaternary ammonium bases and related compounds.

J. Biol. Chem. 1953, 205, 565-74.

BRODIE B.B., UDENFRIEND S.

The estimation of basic organic compounds and a technique for the appraisal of specificity.

J. Biol. Chem. 1945, 158, 705-14.

BRODIE B.B., UDENFRIEND S.

Estimation of basic organic compounds by salt formation with methyl-orange.

J. Biol. Chem. 1947, 168, 335-9.

BROOKS R.T., STERNGLANZ P.D.

Titrimetric determination of the N-oxide group in pyridine-N-oxide and related compounds.

Anal. Chem. 1959, 31, 561-5.

BROWN G.B.

The chemistry and metabolism of adenine-1-N-oxide.

Colloquia - Proceedings of the 4th. Int. Congress of Biochem. Vienna, 1959, vol. 13, p.111-118.

BRUSTIER V., BLANC P.

Sur les spectres d'absorption U.V. de quelques génycalcoïdes.

Bull. Soc. Chim. 1934, 1, 702-12.

BURCKARD P.

Contribution à l'étude de l'oxydation des amines par l'eau oxygénée diluée.

Thèse d'Ingénieur Docteur - Strasbourg, 1963.

BYSTEDT J.

Determination of TMAO in fish muscle.

J. Sci. Food Agr. 1959, 10, 301-4.

CAMPBELL L.L., WILLIAMS O.B.

The action of members of the genus "Achromobacter" on TMAO and related compounds.

J. Bact. 1951, 62, 249-51.

CARON A., PALENIK G.J., GOLDFISH E., DONOHUE J.

The molecular and crystal structure of TMAO.

Acta Cryst. 1964, 17 (1), 102-8.

CASTELL C.H., SNOW J.M.

The effect of pH on the enzymic reduction of TMAO.

J. Fish. Res. Board Can. 1949, 7, 561-2; a.

CASTELL C.H.

Bacteria and the reduction of TMAO.

Food In Canada, 1949, 9 (10), 11-14; b.

CASTEL C.H.

Influence of TMAO on the bacterial reduction of oxidation-reduction indicators.

J. Fish Res. Board Can., 1950, 7, 567-75. in C.A. 1950, 44, 4957 e.

CASTELL C.H., SNOW J.M.

Reduction of TMAO by bacterial enzymes.

J. Fish Res. Board Can., 1951, 8 (4), 195-206.

CELESTE A.C., POLITO H.V.

A rapid method for the quantitative determination of antihistamines and some related compounds by gas-liquid chromatography.

J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 1966, 49 (3), 541-5.

CHAMBON M.

Considérations sur l'altération de certains alcaloïdes au cours de leur extraction par les solvants organiques riches en peroxydes.

IXème Congrès Soc. Pharm. France, 1957, 263-6.

CHARONNAT R., DELABY R.

Sur un nouveau produit dérivé du Pyramidon.

C.R. Acad. Sci. 1929, 189, 850-2.

CHATTEN L.G.

Applications of non aqueous titrimetry to pharmaceutical analysis.

Titrimetric methods, Proc. Symp. Cornwall, Ont. Can. 1961, 129-70. in C.A. 1962, 57, 7385 i.

CHAYKIN S., BLOCH K.

Metabolism of nicotinamide-N-oxide.

Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 213-16

CHAYKIN S., DAGANI M.

The fate of nicotinamide in the mouse. Urinary metabolites.

J. Biol. Chem., 1965, 240 (1), 932-8.

CHEYMOL J., CHABRIER P., DECHEZ-LEPRETRE S.

Le triméthylaminoxyde. Données physico-chimiques, biologiques, physiologiques, pharmacologiques.

Biologie Médicale, 1967, 56 (2), 124-42.

CHIANCONE F.M.

Urinary elimination of TMA in various animals under physiological conditions.

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1940, 15, 579-80

in C.A. 1946, 40, 5817. 7.

CHIANCONE F.M.

The physiological role of TMA.

Med. Sper. Arch. Ital., 1944, 13, 255-80.

in C.A. 1949, 43, 738 f.

CIUSA W., FIORENZI G.

The UV spectra of the m- and p- substituted N-alkyl-derivatives of pyridine.

Boll. Sci. Fac. Chim. Ind. Bologna, 1959, 18, 12-26.

in C.A. 1960, 54, 22.636 f.

CLEMO G.R.

Phenazine series : the pigment of *Chromobacter iodinium*, the phenazine-di-N-oxides.
J. Chem. Soc. 1938, 479-83.

CLEMO G.R., KOENIG H.

N-oxides of nicotinic acid and its esters.
J. Chem. Soc. Suppl. N° 1, 1949, S 231-2.

CLEMO G.R.

The constitution of the pigment of *Chromacter iodinium*.
J. Chem. Soc. 1950, 1481; cité par CHAYKIN 1959.

COATS N.A., KATRITSKY A.R.

Some reactions of 1-methoxy-pyridinium salts and a color test for N-oxides.
J. Org. Chem. 1959, 24, 1836-7.

COCHIN J., DALY J.W.

Rapid identification of analgesic drugs in urine with thin-layer chromatography.
Experientia, 1962, 18, 294-5.

COHEN J.J., KRUPP M.A., CHIDSEY C.A.

Renal conservation of TMAO by the spiny dogfish "*Squalus Acanthias*".
Amer. J. Physiol., 1958, 194 (2), 229-35.

COLOMBATTI V.

Separation and determination of vitamin PP and nicotinic acid in culture broths.
Farmaco (Pavia), Ed. Prat., 1965, 20 (12), 593-5.
in C.A. 1966, 64, 7326 f.

COLOWICK S.P., KAPLAN N.O., CIOTTI M.M.

The reaction of pyridine nucleotides with cyanide and its analytical use.
J. Biol. Chem., 1951, 191, 447-59.

CONWAY E.J.

Microdiffusion analysis and volumetric error (1947) p. 180,
London - Crosby Lockwood.

CONWAY E.J., BYRNE A.

An absorption apparatus for the microdetermination of ammonia.
Biochem. J. 1933, 27, 419-29.

COOK A.S.

A study of the occurrence of TMA in marine animals.
Can. Chem. Met., 1931, 15, 22-23.

COOK D.

The I.R. spectra of TMAO salts.
Canad. J. Chem., 1963, 41 (2), 1127-34.

COPE A.C., FOSTER T.T., TOWLE P.H.

Thermal decomposition of amine-oxides to olefins and dialkylhydroxylamines.
J. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 3929-35.

COULSON R.A., ELLINGER P., HOLDEN M.

A method for the estimation of nicotinamide methochloride in urine.
Biochem. J., 1944, 38, 150-4.

COULSON R.A., STEWART C.A.

Metabolism of nicotinamide, nicotinic acid, and Coramine by new-born and premature infants.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1946, 61, 364-9.

CRAIG J.C.

Tertiary amine-oxide rearrangements. Mechanism.
J. Amer. Chem. Soc., 1961, 83, 1871-8.

CRAIG J.C., NOURI Y.M., WOLF L.

Tertiary amine-oxides rearrangements (N-benzylidimethylamine-oxide).
J. Org. Chem., 1964, 29 (10), 2868-70; a.

CRAIG J.C., MARY N.Y., GOLDMAN N.L., WOLF L.

Tertiary amine-oxides rearrangements. The mechanism of demethylation of nicotine.
J. Amer. Chem. Soc., 1964, 86 (18), 3866-9; b.

CROSS A.D.

Introduction à la pratique de la spectroscopie infra-rouge.
Azoulay - 1967.

CULVENOR C.C.J.

Amine-oxides.
Revs. Pure and Appl. Chem. (Australia), 1953, 3, 83-114.

D'ALESSIO DE CARNEVALLE B.

Determination of nicotinic acid diethylamide.
Publ. Inst. Invest. Microquim. Univ. Nac. Litoral (Rosario, Arg.), 1958, 24 (22), 83-93.
in C.A. 1963, 58, 3873 f.

DANILOVIC M.

Determination of multivitamin preparation by paper chromatography.
Arh. Farm. (Belgrade), 1966, 16 (1), 13-18.
in C.A. 1967, 66, 68.982 9.

DANN W.J., HANDLER P.

The quantitative estimation of nicotinic acid in animal tissues.
J. Biol. Chem., 1941, 140, 201-13.

DARGEL R.

Ausscheidung von Dimethylamin unter Zufuhr methylierter Stickstoff-Verbindungen.
Acta Biol. Med. Ger., 1966, 16(5), 474-9.

DAVIES W.L.

The metabolism of betaine and allied tertiary nitrogenous bases in the ruminant.
J. Dairy Res., 1936, 7, 14-24.

DAVIES W.L.

The fishy flavor of milk on feeding beet by-products.
Proceedings of the 11th. World's Dairy Congr., Berlin, 1937, 2, 8.

- DECHEZ-LEPRETRE S., PORTET R., CHEYMOL J.
Toxicités comparées de TMA, TMAO et de leur association.
Med. Pharmacol. Exp., 1967, 16 (6), 529-35.
- DE LA HUERGA J., POPPER M.D.H.
Urinary excretion of choline metabolites following choline administration in normals and patients with hepatobiliary diseases.
J. Clin. Invest., 1951, 30, 463-70; a.
- DE LA HUERGA J., POPPER M.D.H.
Urinary excretion of choline and TMA after intravenous administration of choline in liver diseases.
J. Lab. Clin. Med., 1951, 38, 904; b.
- DE LA HUERGA J., POPPER H.
Factors influencing choline absorption in the intestinal tract.
J. Clin. Invest., 1952, 31, 598-603.
- DE LA HUERGA J., GYORGI P.
The effects of antimicrobial agents upon choline degradation in the intestinal tract.
J. Clin. Invest., 1953, 32, 1117-20.
- DI ROSA M.
Comparative studies of nicotinic acid and its N-oxide.
Arch. Ital. Sci. Farmacol., 1965, 15 (1-2), 62-4;
in C.A. 1967, 66, 17.885 c.
- DITTMANN J.
Separation of some vitamins by thin-layer chromatography on cellulose.
Deut. Gesundheitsw., 1967, 22 (26), 1217-18
in C.A. 1968, 68, 62.738 j.
- DUNN G., GALLAGHER J.J.
Aspergillioic acid.
J. Chem. Soc., supplément N° 1, 1949, S 126 - S 131.
- DUNSTAN W. R., GOULDING E.
Action of methyl iodide on hydroxylamine.
J. Chem. Soc., (Proc.), 1894, 10, 138-9.
- DUNSTAN W. R., GOULDING E.
The action of hydrogen peroxide on secondary and tertiary aliphatic amines.
Formation of substituted hydroxylamines and oxamines.
J. Chem. Soc., 1899, 75, 1004-11
- DYER W. J., MOUNSEY Y. A.
Colorimetric determination of TMA as the picrate salt.
J. Fish. Res. Board Can., 1945, 6, 351-8.
- DYER W. J., DYER F. E., SNOW J. M.
V. TMAO estimation, VI. TMAO content of fish and marine invertebrates.
J. Fish Res. Board Can., 1952, 8, 309-24.

ELLINGER P., COULSON R.A.

The urinary elimination of nicotinamide methochloride by man.
Biochem. J., 1944, 38, 265-70.

ELLINGER P., ABDELKADER M.M.

Nicotinamide metabolism in mammals.
Biochem. J., 1949, 44, 77-87.

ELLIOTT R.P.

Reduction of TMAO in dogfish flesh.
Food Research, 1952, 17, 225-34.

ERICSON L.E.

Acta Chem. Scand., 1960, 14, 2127-34; cité par BILINSKI, 1964.

FERRIS J.P., GERWE R.D., GAPSKI G.R.

Detoxication mechanisms. II. The iron-catalyzed dealkylation of TMAO.
J. Amer. Chem. Soc., 1967, 89 (20), 5270-5.

FERRUTI P., MARCHISIO M.A.

Inhibition of in-vitro cytotoxic action of silica by synthetic polymers containing N-oxide groups.
Med. Lav., 1966, 57 (8-9), 481-91;
in C.A. 1968, 69, 17.723 k.

FIKE W.W., SUNSHINE I.

Identification of antihistamines in extracts of biological materials, using thin-layer chromatography.
Anal. Chem., 1965, 37 (1), 127-9.

FIKE W.W.

Structure-Rf correlations in thin-layer chromatography of some basic drugs.
Anal. Chem., 1966, 38 (12), 1697-1702.

FISH M.S., JOHNSON N.M.

Oxidative N-dealkylation (preliminary note).
Biochim. Biophys. Acta, 1955, 18, 564-5.

FISH M.S., SWEeley C.C.

Chemical and enzymic rearrangements of N-N-dimethyl amin~~e~~-acid-oxides.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21, 196-7; a.

FISH M.S., SWEeley C.C., HORNING E.C.

Tertiary amine-oxide rearrangements.
Chem. and Ind. Brit., Inds. Fair Rev., April 1956, R. 24 - R. 25; b.

FISHMAN V & al.

Metabolism of chlorpromazine : Isolation and identification of chlorpromazine-N-Oxide.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, 109, 548-552; a.

FISHMAN V., GOLDENBERG H.

Identification of a new metabolite of Imipramine.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, 110, 187-190; b.

FORREST I.S., BOLT A.G., ABER R.C.

Metabolic pathways for the detoxication of chlorpromazine in various mammalian species.
Agressologie 1968, 9 (2), 259-65.

FREEMAN S.K.

Interpretive spectroscopy
(Reinhold Pub. Corp.), 1965.

FRIEDMAN S.

Quantitative separation and identification of quaternary ammonium bases.
Arch. Biochem. Biophys., 1955, 59, 484-90.

FUCHS H.

Über das Schicksal des Cholins und verwandter Substanzen im Tierkörper.
Z. Biol., 1938, 98, 473-478.

GALLAIS F., WOLF R.

Pouvoir rotatoire magnétique de quelques oxydes d'amines.
C.R. Acad. Sci., 1956, 242 (1), 494-6.

GIEDANOWSKI J., PRASTOWSKI W.

Pharmacologic properties of N-oxides of certain antihistaminic drugs.
Arch. Immunol. Therap. Exptl. (Warsaw), 1965, 13 (6), 657-65.

GIGUERE P.A., CHIN D.

An infrared study of TMAO, its hydrate and its hydrochloride.
Canad. J. Chem., 1961, 39, 1214-20.

GOLDBAUM L.R., KAZYAK L.

Identification of alkaloids and other basic drugs by paper partition chromatography.
Anal. Chem., 1956, 28, 1289-90.

GOLDENBERG H., FISHMAN V.

A detailed evaluation of Promazine metabolism.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1964, 115, 1044-51.

GOLDSTEIN L., HARTMAN S.C., FORSTER R.P.

Origin of TMAO in the spiny dogfish "Squalus Acanthias".
Comp. Biochem. Physiol., 1967, 21 (3), 719-722.

GOLUMBIC C., FRUTON J.S., BERGMANN M.

Chemical reactions of the nitrogen mustard gases. VIII. The oxidation of the nitrogen mustard gases by peracids.
J. Org. Chem., 1946, 11, 586-91.

GRIGNARD V.

Traité de Chimie Organique
Masson & Cie, Paris, 1941, tome XII, p. 51-64.

GROLLMAN A.

The urine of the goosfish (Lophius Piscatorius) : Its nitrogenous constituents, with special reference to TMAO.
J. Biol. Chem., 1929, 81, 267-78.

GUGGENHEIM M.

"Die biogenen Amine".

4ème édition, S. Karger, New-York, 1951.

GUVEN K.C., PEKIN O.

Identification of panthotenic acid, folie acid and niacinamide by thin-layer chromatography.

Identification of nikethamide by thin-layer chromatographie.

Eczacilik Bulteni, 1966, 8 (5), 115-23;

in C.A. 1966, 65, 19.932 b.

HALEY Th. J., FLESHER A.M., MAVIS L.

Amines and amine-oxides.

Arch. Intern. Pharmacodyn., 1962, 138, 133-45.

HANTZSCH A., HILLAND W.

Über die Alkylierung des Hydroxylamins.

Ber., 1898, 31, 2058-2063.

HARINATH B.C., ODELL G.V.

Chlorpromazine N-oxide formation by subcellar liver fractions.

Biochem. Pharmacol., 1968, 17 (1), 167-71.

HARPER H.A.

Métabolisme de la choline.

Review of Physiological Chemistry (8ème édition), 1961, p. 92. Lange Medical Publications.

Los Altos. California.

HARTMANN M., ISLER H.

Über die Ausscheidung des Coramins aus dem tierischen Körper.

Klin. Wochschr., 1938, 17, 631-633.

HASHIMOTO Y., OKAICHI T.

Determination of TMA and TMAO. Modification of the Dyer method.

Nippon Suisan Gakkaishi, 1957 et 1958, 23, 269-72;

in C.A. 1959, 53, 4021 a.

HAZARD R., CHEYMOL J., CHABRIER P., SUTTON R.

Dérivés oxygénés de tétramines tertiaires. Etude chimique et pharmacologique.

C.R. Acad. Sci., 1956, 242, 2259-61.

HAZARD R., CHEYMOL J., CHABRIER P., DROUIN M.

Action des sels d'ammonium dérivés de la strychnine et de son aminoxyde sur la contractilité musculaire.

J. Physiol., 1957, 49, 198-202.

HAZARD R., CHEYMOL J., CHABRIER P.

Brevet Fr. l. 278.609, 22 Mars 1962;

in C.A. 1962, 57, 12.319 g.

HEGEMAN M.

Endogene Bildung von TMAO bei Barsch und Hecht.

Naturwissenschaften, 1964, 51 (14), 343-4.

HENZE M.

Über das Vorkommen des TMAO bei Cephalopoden.

Z. Physiol. Chem., 1914, 91, 230-2.

HERRMANN B.

Quantitative Methoden zur Untersuchung des Stoffwechsels von Töfranil.

Helv. Physiol. Pharmac. Acta, 1963, 21, 402-408.

HICKINBOTTOM W.J.

Reactions of organic compounds.

3ème Edition, Longmans, Green & Co, New-York, 1957, p. 420.

HINSBERG K., GANGL-REUSS E.

Über die TMA und TMAO Ausscheidung im Harn von Carcinomkranken.

Z. Krebsforsch., 1942, 52, 227-33.

HIRAOKA E.

The influence of nicotinic acid-N-oxide and nicotinamide-N-oxide on microorganisms.

Bitamin (Kyoto), 1961, 24 (4), 249-52;

in C.A. 1964, 61, 16.475 b.

HIRAOKA E.

The influence of isonicotinamide hydrazide N-Oxide on microorganisms and tryptophanase.

Bitamin (Kyoto), 1961, 24 (4), 253-56;

in C.A. 1964, 61, 16.475 b.

HIRAOKA E.

The mechanism of inhibitory effect of isonicotinamide hydrazide N-oxide on the growth of the microorganisms.

Bitamin (Kyoto), 1961, 24 (4), 256-8;

in C.A., 1964, 61, 16.475 b.

HJORTH-HANSEN S.

Méthode pour le dosage de l'oxyde de triméthylamine.

Anal. Chim. Acta, 1952, 6, 438-41.

HOCHBERG M., MELNICK D., OSER B.L.

Chemical determination and urinary excretion of the metabolite N₁-methylnicotinamide.

J. Biol. Chem., 1945, 158, 265-78.

HOEFT E., SCHULTZE H.

Zur Frage der iodometrischen Bestimmung einiger Aminoxyde.

J. Prakt. Chem., 1963, 19 (5-6), 260-5.

HOLMAN W.I.M.

A colorimetric method for the determination of the principal metabolites of nicotinic acid in human urine.

Biochem. J., 1954, 56, 513-520.

HOPPE-SEYLER F.A., SCHMIDT W.

Über das Vorkommen von TMAO.

Z. Biol., 1928, 87, 59-68; a.

HOPPE SEYLER F.A.

Über die Identität des "Karnirins" mit dem Trimethylaminoxid.
Z. Physiol. Chem., 1928, 175, 300-3; b.

HOPPE SEYLER F.A.

The limitations and significance of biological methylation processes.
Z. Biol., 1930, 90, 433-66;
in C.A. 1931, 25, 542.7.

HOPPE SEYLER F.A.

TMAO and andere Stickstoffbasen in Krebsmuskel.
Z. Physiol. Chem., 1933, 221, 45-50.

HUEBNER C.F.

Paper chromatography of pyridine derivatives.
Nature, 1951, 167, 119-120.

HUFF J.W., PERLZWEIG W.A.

Metabolism and synthesis of nicotinic acid in the rat.
J. Biol. Chem., 1942, 142, 401-15.

HUFF J.W., PERLZWEIG W.A.

The fluorescent condensation product of N-methylnicotinamide.
J. Biol. Chem., 1947, 167, 157-68.

HUGHES R.B.

TMAO and volatile amines in fresh, spoiling, and cooked herring fish.
J. Sci. Food Agr., London, 1959, 10, 431-6.

ISHIDATE M., KOBAYASHI L.

The effects of N-oxide derivatives of nitrogen mustard.
Proceedings of the Japan. Acad., 1951, 27, 493-500.

IWAMOTO T.

Distribution and change of TMA in cat organs, after its parenteral administration.
Yakugaku Zasshi, 1957, 77, 1189-91;
in C.A. 52, 3886 e.

JAKOBSEN F.

Determination of TMAO in biological material.
Tids. Kjemi Bergvesen Met., 1944, 4, 14;
in C.A. 1947, 41, 494 i.

JERCHEL D. & al.

Angew. Chem., 1958, 70, 731-33; cité par VON EULER 1959 d; a.

JERCHEL D., MELLOH W.

Reindarstellung von Methylpyridinen über ihre N-oxyde.
Ann. Chem., 1958, 613, 144-153; b.

JONES H.M., BRADY E.S.

The colorimetric estimation of N-(2-pyridyl)-substituted antihistamine drugs.
J. Amer. Pharm. Assoc., 1949, 38, 579-80.

JUJO R.

Synthesis of 3-bromopyridine derivatives.

J. Pharm. Soc. Japan, 1946, 66, 21-2;

in C.A. 1951, 45, 6200 i.

KAGAN F.

2-(Benzyl 2-dimethylaminoethyl) aminopyridine N-oxides.

U.S. 2,785,170, March 1957, to Upjohn Co; in C.A. 1957, 51, 13,938 d.

KAISER H., JORI H.

Toxicological determination of Dromoran, Morphine, Dilaudid, Cardiazole, Coramin and Atropin, by paper-chromatography.

Arch. Pharm., 1954, 287, 224-42.

KAPELLER-ADLER R., KRAEL J.

Untersuchungen über die Stickstoffverteilung in den Muskeln verschiedener Tierklassen.

Biochem. Z., 1930, 221, 437-60; a.

KAPELLER-ADLER R., KRAEL J.

Stickstoffverteilung in den Muskeln verschiedener Tierklassen.

Biochem. Z., 1930, 224, 364-377; b.

KAWABATA T.

TMAO reductase. Reduction of TMAO in the dark muscle of pelagic migratory fish under aseptic conditions.

Bull. Japan. Soc. Sc. Fisher., 1953, 19, 505-12;

in C.A. 1955, 49, 7138 f.

KERMACK W.O., LEES H., WOOD J.D.

Some non-protein constituents of the tissues of the lobster.

Biochem. J., 1955, 60, 424-8.

KIDA S.

Preparation of TMAO complexes and some I.R. studies.

Bull. Chem. Soc. Japan, 1963, 36 (6), 712-17;

in C.A. 1963, 59, 4679 f.

KIRCHNER J.

Metabolism of nicotamide.

Univ. Microfilms (Ann. Arbor. Mich.), Order N° 65-14,546 (84 pp.)

Dissertation Abstracts, 1966, 26 (8), 4212-13.

KLECKNER L.J., OSOL A.

U.V. absorption spectra of antihistaminic agents.

J. Am. Pharm. Assoc., 1955, 44, 762-5.

KLEIN J.R., PERLZWEIG W.A., HANDLER P.

Determination of nicotinic acid in blood, cells, and plasma.

J. Biol. Chem., 1942, 145, 27-34.

KODICEK E., REDDI K.K.

Paper chromatography of nicotinic acid derivatives

Nature, 1951, 168, 475-6.

KOEKEMOER M.J., WERREN F.L.

The Senecio alkaloids : The occurrence and preparation of the N-oxides.

An improved method of extraction of the Senecio alkaloids.

J. Chem. Soc., 1951, 1, 66-68.

KOISUMI C., HASHIMOTO Y.

The significance of TMAO : I. Studies on "green" tuna.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1965, 31 (2), 157-60.

KOISUMI C., HASHIMOTO Y.

The significance of TMAO : II. Discoloration of cooked tuna meat, due to TMAO.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1965, 31 (6), 439-47.

KÖNIG W.

J. Prakt. Chem., 1904, 69, 105 et 70, 19; cité par GRIGNARD 1941.

KUHN R., VETTER H.

Isolierung von nicotinsäure-amid aus Herz Muskel.

Ber., 1936, 68, 2374-5.

KURODA Y., KIMURA M.

Vibrational spectra of TMAO dihydrate.

Spectrochim. Acta., 1966, 22 (1), 47-56.

KUTSCHER F., ACKERMANN D.

Ann. Rev. Biochem., 1933, 2, 355-75; cité par BEATTY 1939.

LAMBORG M.R. & al.

Relationship of structure to properties of D.P.N. and other pyridinium compounds.

J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 6173-7.

LAMBORG M., STOLZENBACH F.E., KAPLAN O.

The nicotinic acid analogue of D.P.N.

J. Biol. Chem., 1958, 231, 685-94.

LANDAULT C., GUIOCHON G.

Separation of amines by gas liquid chromatography using Teflon as a support.

J. Chromatog., 1964, 13 (2), 327-36.

LANGE R., FUGELLI K.

The osmotic adjustment in the euryhaline teleosts.

Compar. Biochem. Physiol., 1965, 15 (3), 283-92.

LAUER J.

Sur quelques aminoxydes de la série de la Novocaïne.

Bull. Soc. Chim., 1934, 1, 857-60.

LEBEDEV O.L., KAZARNOVSKII S.N.

Oxidation of amines with pertungstate.

Zhur. Obshch. Khim., 1960, 30 (9), 3105-3107;

traduction anglaise : J. gen. Chem. (USSR), 1960, 3079-81.

LEBEDEV O.L., KAZARNOVSKII S.N.

Catalytic oxidation of aliphatic amines with hydrogen peroxide.

Zhur. Obshchei Khim., 1960, 30 (5), 1631-1635;

traduction anglaise : J. gen. Chem. (USSR), 1960, 1629-33.

LEIFER E. & al.

The metabolism of radioactive nicotinic acid and nicotinamide.

J. Biol. Chem., 1951, 190, 595-602.

LEVINE C., CHARGAFF E.

Procedures for the microestimation of nitrogenous phosphatide constituents.

J. Biol. Chem., 1951, 192, 465-479.

LINTZEL W.

Untersuchungen über Trimethylammoniumbasen. III.

Biochem. Z., 1934, 273, 243-261; a.

LINTZEL W.

TMAO im menschlichen Harn.

Klin. Wochschr., 1934, 13, 304; b.

LINTZEL W., PFEIFFER H., ZIPPEL I.

Über das Vorkommen von TMAO in der Muskulatur von Süßwasserfischen.

Biochem. Z., 1939, 301, 29-36.

LOBSTEIN M., Mlle JEANGUYOT

Action de quelques esters, généralcaloïdes et glucosides sur l'excitabilité neuromusculaire.

Bull. Acad. Med., 1935, 114, 523-525.

MAC GAVACK T.H. & al.

J. Allergy, 1948, 19, 251

cité par WEINMAN, 1959.

MACHINIST J.M., ORME-JOHNSON W.H., ZIEGLER D.M.

Microsomal oxidases : I. The isolation of dialkyl-amine-oxygenase of pork liver microsomes.

Biochemistry (Washington), 1966, 5 (9), 2932-2938.

II. Properties of a pork-liver microsomal N-oxide-dealkylase.

Biochemistry (Washington), 1966, 5 (9), 2939-2943.

MALORNY G., RIETBROCK N., SCHASSAN H.T.

Über den Stoffwechsel des Trimethylaminoxids.

Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 1963, 246, 62.

MAO J.C.H., TARDREW P.L.

Demethylation of erythromycins by rabbit tissues in-vitro.

Biochem. Pharmacol., 1965, 14, 1049-1058.

MARONCELLI P., CAMPANA C.

Contributo allo studio del metabolismo dei metili. Comportamento della TMA urinaria nel soggetto normale dopo carico di colina e di metionina.

Acta Vitaminol., 1950, 4, 33-36.

MATHIS-NOEL R., WOLF R., GALLAIS F.

Spectre d'absorption de quelques oxydes d'amines tertiaires.

C.R. Acad. Sci., 1956, 242, 1873-1876.

MEISENHEIMER J.

Über trimethylalkoxylammoniumbasen.

Ann. Chem., 1913, 397, 284-300.

MERCK INDEX of Chemicals and Drugs

7th. Edition. Merck and Co. Inc., 1960.

MERLEVEDE E., POTTIEZ F.

Separation and Identification of quaternary ammonium bases in biological fluids by paper electrophoresis.

Arch. Intern. Pharmacodyn., 1959, 122, 474-489.

MESNARD P.

Analytic aspects of 2-thiobarbituric acid for drug testing.

Archeia tes Farma (Athènes), 1966, 22 (7-8), 105-121..

in C.A., 1967, 66, 118,877 g.

MESTRES R.

Fluorimetric determination of nicotinamide.

Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1962, 22 (1), 46-48.

MILLER R.G.J.

Laboratory methods in infra-red spectroscopy.

(Heyden and Son Ltd.), 1965.

MIYAHARA S.

Chromatographie separation and determination of methylamines in fish.

Nippon Kagaku Zasshi, 1960, 81, 1158-1163.

in C.A., 1962, 56, 7809 f.

MUELLER A., FOX S.H.

Determination of nicotinic acid in pharmaceutical products.

J. Am. Pharm. Assoc., 1951, 40, 513-516.

MÜLLER H.

Über den Cholinstoffwechsel (Teil I und II).

Z. Physiol. Chem., 1940, 266, 205-216.

MÜLLER H., IMMENDORFER I.

Ein Beitrag zum Verhalten des TMA und TMAO im Stoffwechsel.

Z. Physiol. Chem., 1942, 275, 267-276.

MÜLLER E.

Methoden der Organischen Chemie

(Houben-Weyl), 1958, 11 (2), 192.

MUNIER R.

Séparation des alcaloïdes de leurs N-oxydes par micro-chromatographie sur papier.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 1225-1231.

MUNOZ ARMESTAR A.

Spectrophotometric determination of some antihistaminic drugs.

Congr. farm. bioquim. peruano y convencion farm. Norte. Actas y trabajos, 1953, 296-299.

in C.A., 1955, 49, 7193 f.

MURRAY K.N., CHAKRAVERTY K., CHAYKIN S.

TMAO biosynthesis in the bullfrog.

Nature, 1966, 210, 1266-1267; a.

MURRAY K.N., CHAYKIN S.

The enzymatic reduction of Nicotinamide-N-oxide

J. Biol. Chem., 1966, 241 (9), 2029-2034; b.

MURRAY K.N., CHAYKIN S.

The reduction of nicotinamide-N-oxide by xanthine-oxidase.

J. Biol. Chem., 1966, 241 (15), 3468-3473; c.

MURRAY K.N., WATSON J.G., CHAYKIN S.

Catalysis of the direct transfer of oxygen from nicotinamide-N-oxide to xanthine by xanthine-oxidase.

J. Biol. Chem., 1966, 241, (20), 4798-4801; d.

NANTKA-NAMIRSKI P.

The effect of some pyridine derivatives and their N-oxides, and their mono-amine-oxidase and di-amine-oxidase activity.

Acta Physiol. Pol., 1966, 17 (1), 145-157.

in C.A., 1966, 64, 17,936 e.

NEWBOLD G.T. et al.

The oxidation of 2-hydroxy-quinoxaline and its derivatives with hydrogen peroxide.

J. Chem. Soc., 1948, 1, 519-523.

NORRIS E.R., BENOIT G.J.

Studies on TMAO.

J. Biol. Chem., 1945, 158, 433-448.

OCHIAI E., ISHIKAWA M., KATADA M.

XXXI. New conception of tertiary N-oxides.

J. Pharm. Soc. Japan, 1943, 63, 307-313.

in C.A., 1951, 45, 5153 e.

OCHIAI E.

Recent Japanese work on the chemistry of pyridine-l-oxide and related compounds.

J. Org. Chem., 1953, 18, 534-551.

OSWALD A.A., GUERTIN D.L.

Organic nitrogen compounds : peroxide intermediate of tertiary alkylamine oxidation by hydrogen peroxide.

J. Org. Chem., 1963, 28 (3), 651-657.

PATKOWSKI J., POMORSKI J.

Synthesis and pharmacological properties of the N-oxide of the diethylamino ethyl ester of diphenylacetic acid (Adiphenin).

Arch. Immun. Therap. Exp., 1966, 14 (4), 516-523.

in C.A. (1966), 65, 19164 c.

PAWELCZYK E. WACHOWIAK R.

Analysis of the decomposition products of drugs.

Poznan Towarz. Przyjaciol Nauk, Wydział Lekar;

Prace Komisji Farm., 1966, 4, 59-64.

in C.A., 1966, 65, 15155. b.

PELLETIER O., CAMPBELL J.A.

Direct détermination of niacinamide in multivitamin preparations.

J. Pharm. Sci., 1961, 50, 926-928.

PELLETIER O., CAMPBELL J.A.

Determination of nikethamide with cyanogen bromide and barbituric acid.

J. Pharm. Sci. (1962), 51, 594-595.

PERLMAN E.

A quantitative method for the determination of antihistaminic compounds containing the pyridine radical.

J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1949, 95, 465-481...

PERLZWEIG W.A., LEVY E.D., SARETT H.P.

Nicotinic acid derivatives in human urine and their determination.

J. Biol. Chem., 1940, 136, 729-745.

PERNIN P.J.

Le camphosulfonate d'aminoxyde de diphenhydramine.

Thèse, Faculté de Médecine de Paris, 1963, N° 611.

POLLER K., LINNEWEH W.

Über das Vorkommen von TMAO in Clupea Harengus.

Ber., 1926, 59 (1), 1362-1365.

POLONOVSKI M.

Etude sur les alcaloïdes de la Fève de Calabar. Constitution de la gènesérine.

Bull. Soc. Chim., 1917, 21, 191-200.

POLONOVSKI M. et M.

Sur une série de dérivés alcaloïdiques à toxicité atténuée.

C.R. Acad. Sci., 1925, 181, 887-8.

POLONOVSKI M. et M.

Sur les aminoxydes des alcaloïdes.

Bull. Soc. Chim., 1926, 39 (2), 1147-1167.

POLONOVSKI M., NAYRAC P., TIPREZ J.

Le N-oxyde de morphine en thérapeutique.

Bull. Acad. Med., 1930, 103 (3), 174-178; a.

POLONOVSKI M. et M.

Sur les aminoxydes des alcaloïdes : VI. N-oxydes d'hydrastinine et de narcotine.

Bull. Soc. Chim., 1930, 47 (4), 361-365; b.

POLONOVSKI M.

J. Pharm. Chim., 1930, (8) 11, 385-395 et 429-444;

in C.A., 1931, 25, 1289.8; c.

POLONOVSKI M.

La fonction aminoxyde et ses transpositions dans le groupe des alcaloïdes.

Bull. Soc. Chim. Belg., 1930, 39, 1-39; d.

POLONOVSKI M. et M.

Sur les aminoxydes des alcaloïdes : X. Action de l'eau oxygénée sur l'hydrastinine et l'hydrohydrastinine.

Bull. Soc. Chim., 1936, 3 (5), 885-888.

POLONOVSKI M., DESGREZ P.

Les aminoxydes peuvent-ils jouer le rôle de transporteurs d'oxygène ?

C.R. Soc. Biol., 1938, 128, 758-761.

PRENTISS P.G. & al.

The metabolism of choline by the germ-free rat.

Arch. Biochem. Biophys., 1961, 94, 424-429.

PROSSER A.R., SHEPPARD A.J.

Gas-liquid chromatography of niacin and niacinamide.

J. Pharm. Sci., 1968, 57 (6), 1004-1006.

PRUSSMANN R. & al.

A sensitive colour reaction for nitrosemes on thin-layer chromatograms.

Nature, 1964, 201, 502-503; a.

PRUSSMANN R. & al.

Anfärbemethoden und Dünnschicht-chromatographie von organischen N-Nitrosoverbindungen.

Z. Anal. Chem., 1964, 202, 187-192; b.

PURDY S.J., TRUTER E.V.

Quantitative analysis by thin-layer chromatography.

Analyst, 1962, 87, 802-809.

REAY G.A.

Rep. Food Inv. Bd. Gr. Brit., 1938, 1937, 69-71.

cité par DYER, 1952.

REDDI K.K., KODICEK E.

Metabolism of nicotinic acid and related compounds in man and rat.

Biochem. J., 1953, 53, 286-294.

RERAT C.

Structure cristalline du chlorhydrate de triméthylaminoxyde.

Acta Cryst., 1960, 13, 63-71.

in C.A., 1960, 54, 9429 a.

ROBERTSON J.G., BUTLER G.W.

Detection of amides on paper chromatograms.

J. Chromatog., 1964, 13, 262.

RONOLD O.A., JAKOBSEN F.

TMAO in marine products.

J. Soc. Chem. Ind. (London), 1947, 66 (5), 160-166.

SAITO K., SAMESHIMA M.

Turbidity in the colorimetric determination of TMA by Dyer's method.

Nippon Nogei Kagaku-Kaishi, 1956, 30, 531-534.

in C.A., 1958, 52, 8409 b.

SANCHEZ J.A.

Identification and colorimetric determination of Coramine.

Semana Med. (Buenos Aires), 1944, 1, 1269-1273.

in C.A., 1945, 39, 389. 6.

SHENG M.N., ZAJACEK J.G.

The oxidation of tertiary amines to amine-oxides.

J. Org. Chem., 1968, 33 (2), 588-590.

SHEWAN J.M.

The chemistry and metabolism of the nitrogenous extractives in fish.

Biochem. Soc. Symposia, Cambridge (England), 1951, 6, 28-48.

SHIMIZU M. & al.

Synthesis of compounds related to isonicotinic acid hydrazide and their bacteriostatic activity against Mycobacterium tuberculosis.

J. Pharm. Soc. Japan, 1952, 72, 1474-1477.

in C.A. 1953, 47, 8077 h.

SIMATOEANG P.S.M.

The identification of vitamin B complex by paper chromatography.

Suara Pharm. Madjalah., 1959, 4 (3), 67-71.

in C.A., 1963, 58, 13724 h.

SINSHEIMER J.E., MC ILHENNY H.M.

Constituents from "Gymnema Sylvestre" leaves. Nitrogenous compounds.

J. Pharm. Sci., 1967, 56 (6), 732-736.

SOKOLOV S.D., NAIDENOVA N.M.

Reduction of TMAO by thiols.

Zh. Organ. Khim., 1966, 2 (6), 1123.

in C.A., 1966, 65, 16.849 d.

SPECTOR W.S. (éditeur)

Handbook of Toxicology, vol. I : Acute Toxicities, 1956.

STAHMAN M.A., BERGMANN M.

The oxidation of the nitrogen mustard gases by peracids.

J. Org. Chem., 1946, 11, 586-591.

STEVENS M.A. & al.

Purine N-oxides. Mono-oxides of aminopurines.

J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 2755-2758.

STRACK E., BEMM H., ROTZSCH W.

TMA und TMAO im Harn, nach Zufuhr von ¹⁵N Carnitin.

Acta Biol. Med. German., 1963, 11 (1), 14-28.

STRECKER W. & al.

Über die Einwirkung von Ozon auf die Alkalimetalle Ammoniak und Substitutions produkt des Ammoniaks.

Ber., 1920, 53, 2096-2113.

STRECKER W., BALTES M.

Über die Einwirkung von Ozon auf aliphatische und aromatische Substitutionsprodukte des Ammoniaks.

Ber., 1921, 54, 2693-2708.

SUNSHINE I., GERBER S.R.

Spectrophotometric analysis of drugs including atlas of spectra.

Thomas Editor, 1963.

SUNSHINE I., FIKE W.W., LANDESMAN H.

Identification of therapeutically significant organic bases by thin-layer chromatography.

J. Forensic. Sci., 1966, 11 (3), 428-439; in C.A. 1967, 66, 16.972 s.

SUWA A.

Untersuchungen über die Organextrakte der Selachier.

Arch. Ges. Physiol., 1909, 128, 421-426.

SUWA A.

Über das den Muskelextraktstoffen des Dornhais gewonnene TMAO.

Arch. Ges. Physiol., 1909, 129, 231-239.

SUYAMA M.

Formation of ammonia and TMA in elasmobranch fish.

J. Tokyo Univ. Fisheries; Special Ed. III, 1960, 1, 1-152.

in C.A., 1963, 59, 12.238 h.

SWEELEY C.C., HORNING E.C.

Rearrangement and decarboxylation reactions of N-N-dimethyl-glycine-oxide.

J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 2620-2625.

TAGHAVI H.

Recherches sur quelques oxydes d'amines tertiaires et d'acides aminés aliphatiques.

Thèse Sciences (Lille), 1938.

TAKEDA K.

Der Nachweis von TMA im Harn.

Arch. Ges. Physiol., 1909, 129, 82-88.

TARR H.L.A.

Bacterial reduction of TMAO to TAM.

J. Fish. Res. Bd. Canada, 1939, 4, 367-377.

TARR H.L.A.

Specificity of triamine-oxidase.

J. Fish. Res. Bd. Canada, 1940, 5, 187-196.

TARR H.L.A.

Fate of TMA and TMAO in man.

J. Fish. Res. Bd. of Canada, 1941, 5, 211-216.

TATSUMI H., KANAMITSU O.

Yakugaku Zasshi, 1961, 81, 1748, 1754, 1762.

cité par MURRAY, 1966 b.

TATSUTOYO F. & al.

Drug analysis by thin-layer chromatography.

Yakuzaigaku, 1965, 25 (2), 138-142.

in C.A., 1966, 64, 6405 h.

TAYLOR E.C., CROVETTI A.J.

Synthesis of some nicotinic acid derivatives.

J. Org. Chem., 1954, 19, 1633-1640.

TAYLOR E.C., CROVETTI A.J.

Nicotinamide N-oxide

Org. Syntheses, 1957, 37, 63-64. John Wiley & Sons N.Y. ed.

TEICHERT K.

Beitrage zur analytischen Chromatographie.

Dtsch. Apoth. Zig., 1960, 100, 283-285.

TERAYAMA H.

Amino-azo dye amine-N-oxide as a possible intermediate metabolite preceding N-demethylation and ortho-hydroxylation as well as azodye-protein binding.

Gann., 1963, 54, 195-204.

THOMPSON W.E. & al.

Identification of primary, secondary and tertiary pharmaceutical amines by the infra-red spectra of their salts.

J. Pharm. Sci., 1965, 54 (12), 1819-1821.

TOMITA M., TANAKA T.

Phytochemical reduction of TMAO.

J. Biochem. (Japan), 1944, 36, 345-348.

TSUCARIS G.

Contribution à l'étude de la liaison semi-polaire N-O dans quelques aminoxydes.

J. Chim. Phys., 1961, 58, 619-624.

TSUCHIYA Y., ENDO E.

Formation of ammonia and TMA in shark.

Tokohu (J. Agr. Research.), 1951, 2, 119-126.

in C.A., 1952, 46, 11.489 a.

TSUCHIYA Y., ENDO E.

Enzymatic reduction of TMAO.

Tokohu (J. Agr. Research.), 1952, 3, 127-133.

in C.A., 1953, 47, 12.475 b.

TSUYUKI H.

Chemical oxidation of a phosphoramidate to a phosphoramidate-N-oxide anticholinesterase and its subsequent rearrangement.

Biochem. J., 1955, 59, IV-V.

UEHLEKE H., STAHN V.

Zur biologischen Bildung von N-N-dimethylamino-azobenzol-N₄-oxyd aus den Aminen, sowie ihre Reaktionen mit Haemoglobin und mit Lebermikrosomen.

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Path., 1966, 255, 287-300.

UNEMOTO T., HAYASHI M., MIYAKI K.

Intracellular localization and properties of TMAO-reductase in "Vibrio Parahaemolyticus".
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 110 (2), 319-328.

VECERKOVA J. et al.

Über das Papierchromatographische Verhalten der Antihistaminica Ataractica und Ganglioplegica
im Zusammenfassung mit der Konstitution.

J. Chromatog., 1962, 7, 527-534.

VAISEY E.B.

The non-enzymic reduction of TMAO to TMA, dimethylamine and formaldehyde.

Can. J. Biochem. and Physiol., 1956, 34, 1085-1094.

VERLANKAR N.K., GOVINDAN T.K.

A preliminary study of the distribution of non-proteic nitrogen in some marine fishes and
Invertebrates.

Proc. Ind. Acad. Sci., 1958, 47 (B), 202-209.

VERLANKAR N.K., GOVINDAN T.K.

TMAO content of marine prawns, occurring in the backwaters and in the sea of Cochin.

Proc. Ind. Acad. Sci., 1960, 52 (B), N° 4, 111-115.

VIDIC E., SCHUETTE J.

Paper chromatographic analysis of toxicologically important basic poisons and drugs.

Arch. Pharm., 1962, 295, 342-360.

VON EULER H.

Fundamentals and recent results on N-oxides and nucleoproteins in cancer research.

Kyushu J. Med. Sci., 1958, 9, 127-132; a.

VON EULER H., HASSELQUIST H.

Zur Chemie der N-oxyde.

Ark. Kem., 1958, 12 (48), 559-564; b.

VON EULER H., HASSELQUIST H.

N-Oxyde von Aminosäuren und Purinen.

Ark. Kem., 1958, 13 (20), 185-192; c.

VON EULER H.

Zur Kenntnis der N-Oxyde

Ark. Kem., 1958, 13 (25), 225-230; d.

VON EULER H., HASSELQUIST H.

N-Oxyde von Wirkstoffen des oxydo-reduktiven Stoffwechsels.

Ark. Kem., 1959, 13 (44), 439-446; a.

VON EULER H., HASSELQUIST, HEIDENBERGER O.

Kinetische Versuche and N-Oxyden.

Ark. Kem., 1959, 13 (54), 583-589; b.

VON EULER H., HASSELQUIST H.

Reduktion und Radikal-Struktur von N-Oxyde.

Ark. Kem., 1959, 14, 237-246; c.

VON EULER H., HASSELQUIST H., HEIDENBERGER O.

Zur Kenntnis der N-Oxyde.

Chem. Ber., 1959, 92, 2266-2270 ; d.

WALLEN O.

Photometric determination of nicethamide in injectable nicethamide.

Farm. Rev., 1947, 46, 233-236.

in C.A., 1947, 41, 4612 h.

WARREN R.J., THOMPSON W.E., ZAREMBO J.E.

Effect of hydration on the infra-red spectra of tertiary amine salts.

J. Pharm. Sci., 1965, 54, 1554.

WARREN R.J., THOMPSON W.E., ZAREMBO J.E., EISDORFER I.B.

Ultra-violet and attenuated total reflectance infra-red spectra of chlorpromazine metabolites.

J. Pharm. Sci., 1967, 56, 1496-1500.

WATSON D.W.

Fish spoilage : I. The bacterial reduction of TMAO.

J. Fish. Res. Bd. Can., 1939, 4, 252-266.

II. The role of TMAO in the respiration of *Achromobacter*.

J. Fish. Res. Bd. Can., 1939, 4, 267-280.

WAY E.L., DAILEY R.E.

Absorption, distribution and excretion of tripeleminamine.

Proc. Soc., Exptl. Biol. Med., 1950, 73, 423-427.

WEINMAN E.O., GEISSMAN T.A.

Distribution, excretion and metabolism of ¹⁴C labeled tripeleminamine (Pyribenzamine) by the guinea-pig.

J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1959, 125, 1-13.

WIELAND T., BIENER H.

Synthesen von in 4-Stellung substituierten Nicotinsäureamiden über die N-Oxyde.

Ber., 1963, 96, 266-274.

WIEWIROWSKI U., BARANOWSKI P.

Amine oxides of lupine alkaloids (sparteine, lupanine).

Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Chim., 1962, 10, 537; in C.A. 1963, 58, 14.019 b-h.

WILEY R.H., SLAYMAKER S.C.

Pyrimidine-N-oxides and their infra-red absorption characteristics.

J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79 (2), 2233-2236.

WILLIAMS R.T.

Detoxication Mechanisms, 1959, 2e édition, 142-151 et 440-441.

WIMER D.C.

Titrimetric determination of some amine-oxides and phosphine-oxides in acetic anhydride.

Anal. Chem., 1962, 34, 873-874.

WOOD A.J., BAIRD E.A.

Reduction of TMAO by Enterobacteriaceae.

J. Fish., Res. Bd. Canada, 1943, 6, 194-201; in C.A. 1943, 37, 6699.9.

WRANNE L.

Urinary excretion of TMA and TMAO following administration of TMA to normals and patients with liver-diseases.

Acta Med. Scand., 1956, 153, 433-441.

WRONSKA-NOFER T., SOKAL J.

Colorimetric determination of total nicotinic acid in biological material.

Chem. Anal. (Warsaw), 1966, 11 (3), 573-578; in C.A. 1966, 55, 17.347 e.

YAMAKAWA M., TANAKA I., KUBOTA T.

U.V. absorption spectra of TMAO.

J. Mol. Spectry., 1966, 20 (3), 226-232.

YAVORSKII N.P.

Picrates of some drugs.

Farmatsevt. Zh. (Kiev), 1965, 20 (2), 22-25.

in C.A., 1966, 64, 7972 g.

ZIPPEL I.

Über eine Methode zur Bestimmung von TMA und TMAO in Fischmuskel.

Diss. Jena, 1939.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
Premier Chapitre	
GENERALITES SUR LES AMINOXYDES (N-OXYDES)	5
I. Introduction	7
II. Synthèse	9
III. Propriétés physico-chimiques	16
IV. Propriétés physiologiques	24
V. Conclusion	38
Deuxième Chapitre	
TRIMETHYLAMIDE ET TRIMETHYLAMINOXYDE	39
Première Partie : Travaux antérieurs	41
I. Introduction	41
II. Répartition du triméthylaminoxyde	42
III. Rôle biologique du triméthylaminoxyde	46
IV. Préparation du triméthylaminoxyde	47
V. Propriétés physico-chimiques	48
VI. Extraction du triméthylaminoxyde à partir des milieux biologiques	52
VII. Séparation et identification du triméthylaminoxyde	53
VIII. Dosage du triméthylaminoxyde	55
IX. Conclusion	59
Deuxième Partie : Travaux personnels	61
I. Préparation du triméthylaminoxyde	61
II. Propriétés physico-chimiques	63
III. Conclusion	69
Troisième Chapitre	
NICOTINAMIDE	71
Première Partie : Travaux antérieurs	73
I. Introduction	73
II. Propriétés physico-chimiques	74
III. Etude du métabolisme de la nicotinamide	83
IV. Conclusion	89
Deuxième Partie : Travaux personnels	91
I. Synthèse du N-Oxyde de nicotinamide	91
II. Propriétés physico-chimiques	93
III. Méthodes de dosage	112
IV. Essais chez l'animal	116
V. Conclusion	136

Quatrième Chapitre

CORAMINE

Première Partie : Travaux antérieurs	137
I. Introduction	139
II. Propriétés physico-chimiques	140
III. Etude du métabolisme de la Coramine	145
IV. Conclusion	145
Deuxième Partie : Travaux personnels	147
I. Synthèse du N-Oxyde de Coramine	148
II. Propriétés physico-chimiques	149
III. Méthodes de dosage	162
IV. Essais chez l'animal	165
V. Conclusion	176

Cinquième Chapitre

PYRIBENZAMINE

Première Partie : Travaux antérieurs	177
I. Introduction	179
II. Propriétés physico-chimiques	180
III. Etude du métabolisme de la Pyribenzamine	186
IV. Conclusion	190
Deuxième Partie : Travaux personnels	191
I. Synthèse du N-Oxyde de Pyribenzamine	191
II. Propriétés physico-chimiques	193
III. Méthodes de dosage	205
IV. Essais chez l'animal	211
V. Conclusion	220

Sixième Chapitre

DISCUSSION

221

Septième Chapitre

CONCLUSIONS

239

Huitième Chapitre

BIBLIOGRAPHIE

247

